

VIVIANE MILCZEWSKI

INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL OVINA COM SÊMEN REFRIGERADO APLICADO EM DIFERENTES VIAS

Dissertação apresentada como requisito
à obtenção do grau de Mestre. Curso de
Pós-Graduação em Ciências Veterinárias,
Setor de Ciências Agrárias, Universidade
Federal do Paraná.

Orientador:

Prof. Dr. Luiz Ernandes Kozicki

CURITIBA

1999

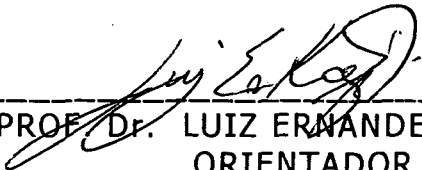
A COMISSÃO EXAMINADORA, ABAIXO ASSINADA,
APROVA A TESE

**INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL OVINA COM SÊMEN
REFRIGERADO APLICADO EM DIFERENTES VIAS**

ELABORADA POR

VIVIANE MILCZEWSKI
MÉDICA VETERINÁRIA

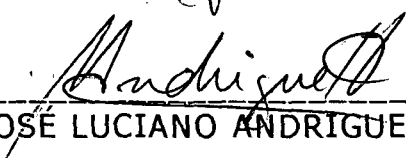
COMISSÃO EXAMINADORA



PROF. Dr. LUIZ ERNANDES KOZICKI,
ORIENTADOR



PROF. Dr. ROMILDO ROMUALDO WEISS



PROF. Dr. JOSÉ LUCIANO ANDRIGUETTO

CURITIBA
1999

Não terei apagadas de minha memória
nem um só instante
de todas as alegrias e insucessos,
aventuras e descobertas
desta fase da minha vida.

Dedico este trabalho aos meus pais Aloize e Rina

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Luiz Ernandez Kozicki, pela orientação deste trabalho.

Ao Méd. Vet. Sérgio Luís Nadal da Luz pelo incentivo, auxílio e participação na execução das atividades de campo.

Ao Prof. Jairo Pereira Neves pela atenção dispensada durante todo este período e pela co-orientação, sem a qual não seria possível a realização desta dissertação.

Ao Prof. Romildo Romualdo Weiss pela orientação e pelo auxílio nos trabalhos de morfologia espermática.

Aos Médicos Veterinários Ana Sílvia Fisher e Mário Fisher, que gentilmente cederam os animais dos parques da Prefeitura Municipal de Curitiba para os experimentos.

À Prof^a. Cristiane Otto e ao Prof. Luimar Perly que permitiram a utilização das instalações, bem como a colheita de sêmen dos reprodutores do Setor de Ovinocultura da Fazenda Experimental do Canguiri - UFPR.

Aos proprietários da cabanha La Belle Pomme, Sr. Luis Renato Krause e Cabanha Suffolk's Village, Sr. Walfrido Leal pelo empréstimo de equipamentos e animais.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, nas pessoas do Prof. Metry Bacila e da Prof^a. Clotilde de Lourdes Branco Germiniani pelo incentivo, solicitude permanente, auxílio financeiro e especialmente pelo exemplo de dedicação que nos deram no transcorrer de todos estes anos.

Aos funcionários do Setor de Ovinocultura da UFPR e dos Parques Municipais de Curitiba que sempre estiveram presentes nos trabalhos de

campo independente do horário em que foram solicitados.

Às secretárias do Curso de Pós-Graduação, Tânia Mara Schrank e Deleuze Cherobim, pelo auxílio nas atividades burocráticas neste período.

À AVEPER que em convênio com a CAPRJPAPAR cedeu equipamentos para a execução dos experimentos.

À CAPES pela bolsa concedida no decorrer do curso e ao CNPQ pela aprovação do projeto de tese e auxílio financeiro para a aquisição do Aparelho Ultrassonográfico.

Aos colegas de pós-graduação, pelos momentos de estudo e descontração que passamos juntos e especialmente a Samuel Pereira Brito que tão bem nos ensinou a valorizar a vida e aceitar as dificuldades impostas em nossos caminhos.

Ao colega Luiz Fernando Madureira Oliveira pela disposição em auxiliar em todos os trabalhos.

Ao meu amigo Jvan Roque de Barros Filho pela companhia, amizade e por toda ajuda nos trabalhos de campo e de laboratório.

Ao Ricardo Vilani pela paciência, incentivo e colaboração na confecção desta dissertação.

Aos meus pais e irmãos pelo preocupação, carinho e apoio em todos os instantes.

Agradecimento especial a amiga e sócia:
Cristina Santos Sotomaior pela amizade intensa e verdadeira, pelo apoio, incentivo e auxílio incansáveis desde o momento do planejamento de todo este trabalho. Cristina, que o término deste longo trabalho seja uma abertura de horizontes para nossos investimentos.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 CONSERVAÇÃO DO SÊMEN A 5°C.....	4
2.2 MORFOLOGIA ESPERMÁTICA APÓS REFRIGERAÇÃO E TESTE DE TERMO-RESISTÊNCIA.....	6
2.3 RESULTADOS DE OVELHAS INSEMINADAS COM SÊMEN REFRIGERADO EM DIFERENTES DILUENTES.....	7
2.4 INFLUÊNCIA DO LOCAL DE DEPOSIÇÃO DO SÊMEN NA FÊMEA.....	10
2.5 INFLUÊNCIA DO HORÁRIO DE INSEMINAÇÃO.....	12
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1 AVALIAÇÃO DOS DILUENTES.....	16
3.2 COLHEITA E DILUIÇÃO DO SÊMEN PARA A INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL.....	20
3.3 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL.....	21
3.4 DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO.....	24
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	24
4 RESULTADOS.....	27
4.1 AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DO SÊMEN REFRIGERADO.....	27
4.2 TAXAS DE PRENHEZ APÓS A INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL.....	33
5 DISCUSSÃO.....	36
6 CONCLUSÕES.....	48
ANEXO 1 - FÓRMULA DOS DILUENTES.....	49
ANEXO 2 - CÁLCULOS ESTATÍSTICOS.....	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

LISTA DE TABELAS

1	Resultados de parição de ovelhas, após inseminação por via cervical com sêmen fresco diluído e refrigerado.....	9
2	Classificação das anormalidades espermáticas	18
3	Avaliação <i>in vitro</i> de sêmen ovino fresco e após 8 horas de refrigeração em 6 diluentes à temperatura de 5°C. Curitiba (PR), 1999.....	27
4	Valores de motilidade progressiva, turbilhonamento e vigor na 4ª hora do TT de sêmen ovino refrigerado em 6 diluentes por 8 horas à temperatura de 5°C. Curitiba (PR), 1999.....	30
5	Avaliação da morfologia espermática em sêmen ovino fresco e refrigerado em 6 diluentes por 8 horas à temperatura de 5°C. Curitiba (PR), 1999.....	32
6	Taxas de prenhez de ovelhas inseminadas por via intra-uterina com sêmen refrigerado em 2 diluentes por 8 a 10 horas à temperatura de 5°C. Curitiba (PR), 1999.....	33
7	Taxas de prenhez de ovelhas inseminadas por via cervical com sêmen refrigerado em 2 diluentes por 8 horas à temperatura de 5°C. Curitiba (PR), 1999.....	34
8	Taxas de prenhez de ovelhas inseminadas com sêmen refrigerado em citrato-gema à temperatura de 5°C, considerando o local de deposição do sêmen e o momento de inseminação. Curitiba (PR), 1999.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AVEPER	Associação de Médicos Veterinários de Pequenos Ruminantes do Estado do Paraná
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CIDR	Controlled Internal Drug Release Dispender
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CUE	Cornell University Extender
CU-16	Cornell University - 16
eCG	Equine Chorionic Gonadotrophin
FGA	Fluorogestone Acetate
LH	Luteinizing hormone
MAP	Medroxyprogesterone Acetate
PMSG	Pregnant Mare Serum Gonadotrophin
TRIS	Hidroximetil aminometano
TT	Teste de termo resistência
UHT	Ultra heat treated

RESUMO

Inseminação artificial ovina com sêmen refrigerado aplicado em diferentes vias.

O presente trabalho objetivou inicialmente comparar a eficiência *in vitro* de 6 diluentes na conservação de sêmen ovino à temperatura de 5°C por 8 horas. Em uma segunda etapa 140 ovelhas foram inseminadas para avaliação de 2 dos diluentes que demonstraram maior eficiência *in vitro*, pelas vias cervical superficial e intra-uterina, em diferentes momentos de aplicação após a sincronização do estro. Foram constituídos 23 homogeneizados de sêmen, divididos em 6 alíquotas, nos quais foram acrescentados os diluentes Cornell University Extender (CUE), Cornell University 16 (CU-16), glicina-gema, citrato-gema, TRIS-gema e leite desnatado UHT-gema. Após 8 horas de refrigeração o sêmen diluído foi submetido a análise de turbilhonamento, motilidade progressiva, vigor, morfologia espermática e ao teste de termo-resistência (TT) por 4 horas. O citrato-gema apresentou resultados superiores em relação aos demais diluentes e glicina-gema foi inferior ($P < 0,05$). No TT o citrato-gema apresentou resultados superiores, concluindo o teste com 50% de motilidade progressiva média, porém os diluentes glicina-gema e leite-gema demonstraram motilidade progressiva próxima a zero ao final do teste. Não foram observadas diferenças significativas na proporção de defeitos maiores e desprendimento de acrossoma em quaisquer dos 6 diluentes após 8 horas de refrigeração. Observou-se aumento significativo de caudas enroladas em todas as amostras de sêmen, exceto nas com glicina-gema. Analisando todas as características estudadas *in vitro*, verificou-se que o diluente citrato-gema apresentou melhor preservabilidade do sêmen de carneiro, seguido pelo CUE. Esses 2 diluentes foram submetidos à avaliação *in vivo*, inseminando-se 140 ovelhas mestiças Suffolk, as quais tiveram o estro sincronizado com pessários vaginais impregnados com 50 mg de acetato de medroxiprogesterona, permanecendo por 14 dias, quando se administrou 500 UI de Equine Chorionic Gonadotrophin intramuscularmente. A aplicação do sêmen foi pela via cervical e intra-uterina por laparoscopia. A utilização do diluente CUE resultou em 69,56% ($n=23$) e 8,33% ($n=24$) de prenhez para as vias intra-uterina e cervical, respectivamente contra 85,71% ($n=21$) e 21,74% ($n=23$) para o diluente citrato. O sêmen diluído em citrato-gema forneceu índices de prenhez superiores, porém não significativos ($P > 0,05$), nas duas vias estudadas em relação ao CUE. Esses resultados de prenhez confirmam o experimento realizado *in vitro*, quando se verificou superioridade do diluente citrato-gema. A taxa de prenhez de ovelhas inseminadas com diluente citrato-gema no mesmo horário após a retirada dos pessários, forneceu 85,71% e 43,75% de prenhez nas vias intra-uterina e cervical, respectivamente. A fertilidade foi superior quando se utilizou a via intra-uterina ($P < 0,05$).

nos 2 diluentes testados. As inseminações realizadas por via cervical com sêmen refrigerado em citrato-gema às 57 ± 1 horas e às 49 ± 1 horas após a retirada dos pessários, obtiveram 43,75% e 21,74% de prenhez, respectivamente. O grupo inseminado às 57 ± 1 horas, apresentou resultados superiores ($P < 0,05$). Foi possível refrigerar o sêmen ovino por 8 horas em citrato-gema obtendo-se boas taxas de prenhez quando se utilizou a via intra-uterina, porém os resultados foram razoáveis na inseminação cervical superficial. A capacidade de fertilização do sêmen refrigerado é satisfatória desde que seja depositado próximo ao sítio de fertilização.

ABSTRACT

Different ways of sheep artificial insemination
using cooled semen.

The aim of this work was to compare *in vitro* efficiency of 6 extenders in the conservation of ram semen at 5°C for 8 hours. Subsequently, with best *in vitro* results were used to inseminate 140 ewes. Twenty-three pooled ejaculates were diluted in 6 extenders: Cornell University Extender (CUE), Cornell University - 16 (CU-16), glycine-yolk, citrate-yolk, TRIS-yolk and UHT skim milk-yolk. After 1+3 dilution, the semen samples were cooled during 8 hours at 5°C following analysis of progressive motility, vigor, wave motion, morphology of spermatozoa and thermoresistance test (TT). Citrate-yolk extended semen results were significantly ($P<0,05$) superior. Glycine-yolk extended semen results were significantly inferior. During TT, citrate-yolk extended semen demonstrated the best results ($P<0,05$), finishing the test with the average of 50% of progressive motility. When Glycine-yolk and UHT skim milk-yolk extenders were used progressive motility was near zero. There were no significant differences in percentage of major defects and detached acrosomal caps with all 6 diluters after 8 hours of conservation. CUE, CU-16, citrate-yolk, TRIS-yolk and UHT skim milk-yolk extended semen showed significantly increased rates of bent tail. When all characteristic studied *in vitro* were analyzed, the citrate-yolk extender showed the best semen preservability followed by CUE. So both were evaluated *in vivo* with cooled semen for 8 hours at 5°C. One hundred and forty crossbred Suffolk ewes had the estrus synchronized with intravaginal pessaries containing 50 mg of medroxyprogesterone acetate. In the fourteenth day, at the same time of the removal of the pessaries, 500 UI of Equine Chorionic Gonadotrophin (eCG), were injected intramuscularly. Cervical and intrauterine insemination were performed with the aid of a laparoscope. CUE extended semen showed insemination pregnancy rates of 69,56% and 8,33% with the uterine and cervical methods respectively. Citrate-yolk extended semen showed 85,71% and 21,74% with the uterine and cervical methods respectively. Citrate-yolk extended semen resulted in higher pregnancy rates, using both insemination methods, however, without statistic significance ($P>0,05$). These insemination rates confirmed *in vitro* performances in which citrate-yolk extended semen demonstrated superiority results. The pregnancy rates of the

groups inseminated with cooled semen extended in citrate-yolk, 55–58 hours after pessaries removal were 85,75% and 43,75% for intrauterine and cervical insemination, respectively. There was significant difference ($P<0,05$) between the groups. The cervical inseminations with cooled semen extended in citrate-yolk at 57 ± 1 hours and 49 ± 1 hours after pessaries removal, resulted in 43,75% and 21,74% pregnancy rates, respectively. The group inseminated at 57 ± 1 hours presented significantly superior results ($P<0,05$). It was possible cool ram semen for 8 hours in citrate-yolk extender with good pregnant rates when intrauterine insemination was used, but the results were modest when cervical inseminations were used. The fertilization capability of cooled ram semen is satisfactory if the semen is deposited near the fertilization site.

1 INTRODUÇÃO

O ovino apresenta-se como espécie de grande importância econômica, difundindo-se por quase todas as regiões do mundo. Em alguns países, como Austrália, Nova Zelândia, Uruguai e Argentina, a ovinocultura representa a base da economia do país, sendo os animais criados em avançados sistemas de produção, possibilitando a obtenção de elevada rentabilidade econômica. Em outros países, a exploração é feita empregando-se técnicas incipientes, representando, em conjunto com a caprinocultura, a subsistência de populações desfavorecidas.

Levando-se em consideração o enorme potencial econômico da ovinocultura, devido à produção de lã, pele ou carne, tornando-se este um componente da mais alta consideração na economia dos estabelecimentos dedicados à produção de ovinos, é oportuno pensar em alternativas que determinem elevada produtividade à realidade brasileira (NEVES, 1990). Torna-se necessária a modernização das técnicas de criação, que exigem a intensificação de processos reprodutivos e uso de material genético qualificado, visando atingir todo o potencial econômico dessa atividade.

No Estado do Paraná a criação e o consumo da carne ovina tem crescido rapidamente. Em 1990 o rebanho era constituído por 385.316 cabeças, passando para 630.500 no ano de 1996 (SEAB, 1997). Esse aumento da população ovina paranaense deveu-se à importação de animais da América do Norte e Europa e ao Programa Estadual de Incentivo a Ovinocultura.

Por esse fato, existem rebanhos com características distintas no Paraná. Alguns rebanhos são constituídos por cabanhas dedicadas à criação de matrizes e reprodutores de alta performance genética com aptidão para a produção de carne. Outro segmento do rebanho é formado por animais mestiços utilizados na produção de carne e lã.

Atualmente a maioria desses ovinos são oriundos do programa promovido pela Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Paraná que nos anos de 1988 a 1994 proporcionou a vinda de 187.000 animais, de dupla aptidão, do Uruguai e do Estado do Rio Grande do Sul.

A adoção de biotécnicas reprodutivas, tais como, indução de estro e inseminação artificial (IA), permitiria a expansão da utilização dos genótipos altamente produtivos dos animais puros com aptidão para carne nos rebanhos gerais. Dessa forma, custos de manutenção dos machos poderiam ser reduzidos, minimizando dificuldades que esses acarretam ao manejo da propriedade além de possibilitarem a obtenção de cordeiros precoces e mais pesados para o abate.

A inseminação artificial, utilizando-se de sêmen fresco, sem meio de preservação, tem sido utilizada no País. Apesar desse método alcançar bons índices de prenhez, requer a presença dos machos junto às fêmeas a serem inseminadas (CHEMINEAU e COGNIE, 1991).

Outra possibilidade seria a utilização de sêmen congelado. A congelação, os riscos representados pela falta de nitrogênio durante a manutenção do material congelado e a exigência de laparoscopia para a aplicação implicam em aumento de custos, sendo elementos limitantes do emprego do sêmen congelado em larga escala.

A utilização de sêmen conservado, principalmente sob a forma de refrigeração seria alternativa viável no Estado do Paraná, uma vez que os rebanhos são, de maneira geral, pequenos e de localização próxima.

Partindo dessas premissas, este trabalho objetiva:

- a) comparar *in vitro* a eficiência de 6 diluentes na conservação do sêmen à temperatura de 5°C por 8 horas.
- b) avaliar taxas de prenhez em ovelhas inseminadas com sêmen refrigerado por via intra-uterina e cervical em 2 horários diferentes de inseminação após a sincronização de estro.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CONSERVAÇÃO DO SÊMEN A 5°C

“O Médico Veterinário russo ELIAS IVANOV efetuou em 1901 as primeiras inseminações artificiais em ovelhas procurando esclarecer a função do frio na conservação do sêmen” (MIES FILHO, 1987).

Para prolongar a capacidade fecundante do espermatozóide são utilizadas temperaturas de armazenamento de 5°C a 15°C, reduzindo ou interrompendo temporariamente a motilidade e reações metabólicas. O método consiste em refrigerar o sêmen diluído de 30°C para 15°C ou mais freqüentemente a 5°C e mantê-lo nessa temperatura até a utilização (EVANS e MAXWELL, 1987). O procedimento prático é o de colocar o sêmen diluído em tubo e este em recipiente contendo água, levando-se o conjunto ao refrigerador para abaixamento progressivo da temperatura em 1°C a cada 3 ou 4 minutos (MIES FILHO, 1987). Os espermatozóides são particularmente suscetíveis a choques térmicos durante a refrigeração de 18°C a 5°C (EVANS e MAXWELL, 1987).

Os diluentes são acrescidos ao sêmen logo após a colheita objetivando manter a capacidade fecundante dos espermatozóides e possibilitando a inseminação em um maior número de fêmeas. Esses diluentes proporcionam nutrientes, meio tamponado e isotônico e protegem os espermatozóides contra choques térmicos (CÓRDOVA *et al.*, 1989).

O diluente ideal deve ser simples de preparar e manejar, de baixo custo e constituir-se de ingredientes acessíveis (CÓRDOVA *et al.*, 1989), além de manter boa motilidade e morfologia espermática normal durante a estocagem, a fim de lograr boa fertilidade (DEKA e RAO, 1980 b).

Diversos tipos de diluentes têm sido propostos para a conservação de sêmen ovino. Dentre os diluentes naturais destaca-se o leite de vaca,

que pode ser usado na forma integral, desnatado, reconstituído ou ultrapasteurizado. O leite possui lactenina, proteína tóxica aos espermatozóides, porém o aquecimento por 10 minutos à temperatura de 92°C promove a inativação dessa proteína (THACKER, 1954). O leite ultrapasteurizado é a forma preferida por ser produto estéril, de fácil aquisição e não requer aquecimento (EVANS e MAXWELL, 1987).

Os diluentes a base de leite e suas diversas variações, parecem ser vantajosos como conservadores de sêmen ovino e têm sido largamente utilizados em diferentes partes do mundo (HILL *et al.* 1958; JONES 1969; PETRUZZI *et al.*, 1976; DEKA e RAO 1980a; CÓRDOVA *et al.*, 1989; CHEMINEAU e COGNIÉ, 1991).

TIWARI *et al.*, (1977) estudando trocas metabólicas concluíram que o leite isoladamente não é meio adequado de estocagem para o sêmen de carneiro após 8 horas a 5°C, devido ao rápido acúmulo de ácido láctico resultando em significativa queda do pH e conseqüentemente em alta mortalidade dos espermatozóides.

COLAS *et al.*, (1968), concluíram que o leite é um diluente mais apropriado para a refrigeração a 15°C, já que aos 5°C muitos espermatozóides morrem e também após as 10 horas de armazenamento ocorre um decréscimo na fertilidade.

Os diluentes sintéticos contém hidroximetil aminometano (TRIS) ou citrato como tampões, glicose ou frutose como fonte de energia e gema de ovo para proteger as membranas celulares dos espermatozóides contra choques térmicos (EVANS e MAXWELL, 1987).

DAUZIER *et al.*, (1954) reportaram que a motilidade dos espermatozóides de carneiro foi mantida por mais tempo em diluentes à base de citrato do que em leite.

PETRUZZI *et al.*, (1976) não observaram diferenças entre 6 diluentes testados, para sêmen ovino, avaliando-os quanto à motilidade 4 horas após refrigeração a 5°C. Às 24 horas o TRIS e citrato foram superiores aos diluentes à base de leite. Com 120 horas foram obtidos

valores de 45%, 26%, 23% e zero de motilidade para o TRIS, citrato, leite com e sem gema de ovo, respectivamente. A diferença na percentagem média de espermatozóides móveis entre o diluente TRIS e os demais foi significativa a partir de 48 horas de refrigeração.

DEKA e RAO (1980a) relataram que os diluentes TRIS-glicose e leite integral foram superiores ao citrato na preservação de sêmen ovino a 5°C, sinalizando que o sêmen dessa espécie poderia ser mantido nestes dois diluentes por mais de 72 horas com motilidade progressiva satisfatória. O TRIS demonstrou maior facilidade de avaliação microscópica por apresentar maior clareza que o leite. Apesar da motilidade no diluente citrato ter sido menor, mais de 50% da motilidade inicial foi mantida após 72 horas de conservação.

Investigações de ROY e BISHOP (1954) mostraram que a substituição de tampões fosfato ou citrato por glicina aumentou o tempo de sobrevivência de espermatozóides bovinos conservados. Esses relatos foram corroborados por AHMED (1955) que obteve maior longevidade dos espermatozóides ovinos em soluções de glicina comparadas com diluente citrato.

SCHINDLER e AMIR (1961) relataram que a glicina acrescida nos diluentes promove benefício na longevidade de espermatozóides mantidos a 4°C, uma vez que o diluente citrato-glicina manteve a motilidade espermática por períodos superiores ao citrato sem gema, e ao leite integral de vaca ou ovelha com ou sem gema.

Os diluentes Cornell University Extender (CUE) e Cornell University-16 (CU-16) inicialmente empregados para conservação de sêmen bovino (FOOTE e BRATTON, 1960), passaram a ser utilizados para sêmen ovino refrigerado por SAXENA e SINGH (1967), PRASAD e NORMAN (1969) e SAHNI e ROY (1969) com bons resultados sobre a motilidade.

Mais recentemente, BUTSWAT *et al.*, (1992), utilizando técnicas de diálise em temperatura ambiente com o uso do diluente CUE,

obtiveram média de 80% e 6% de espermatozóides móveis no primeiro e no oitavo dia de conservação respectivamente.

2.2 MORFOLOGIA ESPERMÁTICA APÓS REFRIGERAÇÃO E TESTE DE TERMO-RESISTÊNCIA

Após a diluição e refrigeração alguns danos provocados nas células espermáticas podem não afetar significativamente a motilidade, porém rompem a integridade das membranas dos espermatozóides. Estas alterações interferem seriamente na sobrevivência e capacidade fecundante dos espermatozóides no trato genital feminino (MARTIN, 1968; MAXWELL e WATSON, 1996).

Uma vez que a integridade do acrossoma e da cauda são indispensáveis à fertilização do óvulo, é essencial sua preservação durante o manejo e processamento do sêmen (EVANS e MAXWELL, 1987).

Estudos biométricos da cabeça de espermatozóides conservados nos diluentes à base de leite desnatado-gema, bicarbonato-glicose-gema, citrato-gema e CUE, foram efetuados por SAXENA e SINGH (1967) não sendo observadas alterações significativas no comprimento ou largura da cabeça das células em todos os diluentes testados. Porém, em estudos realizados por KARCHE *et al.*, (1976) com diluentes à base de citrato, glicina e leite, foi observada diminuição significativa da cabeça das células em todos os diluentes testados, sendo que o diluente citrato apresentou melhor preservabilidade comparado ao citrato-glicina e este melhor que glicina-gema.

DEKA e RAO (1980b) obtiveram resultados semelhantes, verificando diminuição significativa da cabeça dos espermatozóides nos 3 diluentes testados: citrato, TRIS e leite integral. De acordo com KARCHE *et al.*, (1976) e DEKA e RAO, (1980b), o decréscimo no tamanho do

espermatozóide ocorre devido a alterações morfológicas e contração do acrossoma.

Segundo DREVIUS (1963) e BARTH e OKO (1989) o estresse térmico e a hiposmolaridade das soluções conservantes aumentam significativamente a proporção de defeitos de cauda.

Além da morfologia espermática, outro teste utilizado para a avaliação de sêmen conservado é o de termo-resistência (TT). Para a viabilidade do teste, é recomendada a incubação das amostras a 37°C, que é uma temperatura próxima à corporal e simula o ambiente *in vivo* (EVANS e MAXWELL, 1987; CHEMINEAU e COGNIÉ, 1991). LUZ (1991) verificou correlação entre o número médio de espermatozoides móveis durante o TT e o índice de prenhez das ovelhas inseminadas com as diferentes amostras de sêmen congelado.

PAGANINI *et al.*, (1997) submetendo amostras de sêmen refrigerado ao teste de exaustão a 37°C por 4 horas, verificaram aumento linear significativo de defeitos de acrossoma e de cauda a cada hora do teste, porém assim como VEKSLER HESS *et al.*, (1997) não observaram diferenças entre os diluentes testados (glicina-gema, glicina-gema-leite, gema-leite)

PAGANINI *et al.*, (1997) observaram médias de 50 a 55% de espermatozoides com motilidade progressiva em amostras refrigeradas por 24 horas e submetidas por 4 horas ao TT, nos diluentes acima citados.

2.3 RESULTADOS DE OVELHAS INSEMINADAS COM SÊMEN REFRIGERADO EM DIFERENTES DILUENTES

São grandes as variações na taxa de prenhez de ovelhas inseminadas com sêmen refrigerado, mesmo quando se utilizam diluentes semelhantes (MARTIN e WATSON, 1976).

Esta variabilidade deve-se a vários fatores. LAPWOOD *et al.*, (1972) e MARTIN e WATSON (1976) observaram diferenças significativas entre inseminadores, carneiros, ejaculados do mesmo carneiro e momento de inseminação.

No Brasil são poucos os trabalhos que retratam resultados de inseminação artificial em ovinos com sêmen refrigerado (JOBIM *et al.*, 1987; CRUZ, 1994). Os pioneiros na utilização de sêmen refrigerado armazenado na forma líquida, foram MIES FILHO e RAMOS (1954), obtendo resultados de 0 a 61,7% de taxa de parição, utilizando como diluente leite desnatado.

Na tabela 1 estão sumarizados os resultados obtidos em ovelhas inseminadas com sêmen diluído e refrigerado. Os diluentes à base de leite, seguidos pelos diluentes à base de diluente citrato, foram os mais utilizados entre os diversos autores, tanto na conservação à temperatura de 4 a 5°C como na inseminação com estro natural ou sincronizado.

TABELA 1- Resultados de parição de ovelhas, após inseminação por via cervical com sêmen fresco diluído e refrigerado.

Referência	Diluyente	Temperatura (°C / horas)	N.º de espermatozoides (X 10 ⁶)	Estro	Parição (%)
LAPWOOD <i>et al.</i> (1972)	leite desnatado	5 / 24	100	natural	26,1
BARLOW <i>et al.</i> (1974)	leite desnatado	10 a 15 / 5	150	sincronizado	52 a 75
	citrato glicose				(concepção) 25 a 55
MARTIN e WATSON (1976)	salina-glicose- gema	5 / 18	25 a 100	natural	30,7
WATSON e MARTIN (1976)	salina-glicose- gema	5 / 24	100	natural	16,3-27,1
		5 / 48			(não-retomo) 0 - 10
SMITH <i>et al.</i> (1978)	leite desnatado	15 / 12	400 IA dupla	sincronizado	60,2
		15 / 4	400 IA única		71,7
LANGFORD <i>et al.</i> (1979)	leite-citrato	16 / 12	720 IA dupla	Sincronizado	78
CARMENATE e GANCIK (1982)	citrato-gema	sêmen diluído ^a	200 a 300	natural	62,5
	leite desnatado				63,6
CARMENATE e GANCIK (1982)	citrato-gema	5 / 12	200 a 300	natural	61,7
	leite desnatado				53,8
NEVES <i>et al.</i> (1982)	TRIS	sêmen diluído ^b	40	natural	53
			20		(não retomo) 64
JOBIM <i>et al.</i> (1987)	PBS	5 / 8	180	sincronizado	45
RODRIGUEZ <i>et al.</i> (1988)	citrato-aloe vera	5 / 24	180	implantes com progesterona	50 óvulos fertilizados
CÓRDOVA <i>et al.</i> (1989)	leite desnatado	15 / 8	300 ^c	natural	68,6 (gestação)
BUTSWAT <i>et al.</i> (1990)	CUE	1 dia ^d	250 a 500	natural	38,9
		2 dias ^d			16,7
		3 dias ^d			11,1
AGUER <i>et al.</i> (1992)	leite desnatado	15 / 6	400	sincronizado	88% dos plantéis = 50 a 79
CRUZ (1994)	lactose-glicerol	4 / 48	300	sincronizado	7,4
	lactose-glicerol-JYP ^e				11,11

^a Inseminação até 120 minutos após a colheita do sêmen.^b Sêmen diluído e utilizado logo após a diluição a 30°C.^c Número de espermatozoides móveis.^d Conservação por diálise descontinua em temperatura ambiente^e Fração ativa da água de coco. Ácido indoil-3-acético.

2.4 INFLUÊNCIA DO LOCAL DE DEPOSIÇÃO DO SÊMEN NA FÊMEA

A inseminação artificial em ovelhas pode ser realizada pelas vias vaginal, cervical ou intra-uterina. O local de deposição do sêmen na fêmea influencia diretamente a capacidade de fecundação (SOUZA, 1993), sendo que o índice de fertilidade aumenta linearmente à medida que a inseminação se processa em maior profundidade no trato genital da ovelha (EPPLESTON *et al.*, 1994).

Os métodos de inseminação que não exigem a passagem da pipeta através da cérvix da ovelha apresentam simplicidade e rapidez de execução.

A inseminação artificial vaginal “shot in the dark”, além de dispensar o uso de espéculo e fonte de luz, facilita a inseminação em borregas. Este método, contudo, requer elevado número de espermatozóides por fêmea e resulta em baixos índices de fertilidade para sêmen congelado (MIES FILHO, 1983; MAXWELL e HEWITT, 1986). Quando o sêmen conservado na forma líquida é depositado na vagina a fertilidade é em torno de 10% inferior em relação à deposição cervical superficial (CHEMINEAU e COGNIÉ, 1991), e esta 10% inferior à deposição cervical profunda (TEN EN BON, 1965 *apud* SALAMON e MAXWELL, 1995).

A inseminação artificial pelo método cervical, tradicionalmente, é a mais utilizada em ovelhas, dispensando o uso de técnicas e equipamentos sofisticados, anestesia, depilação ou jejum prévio, facilitando desta forma a sua utilização. Porém, um aspecto importante do desenvolvimento da inseminação artificial por via exocervical é o alto grau de variabilidade dos resultados de fertilidade alcançados, que em muitas ocasiões chega a comprometer a viabilidade de seu emprego (LÓPEZ-BREA, 1996).

Os componentes do espermatozoide responsáveis por baixas taxas de fertilidade na inseminação artificial cervical ainda não estão claramente entendidos. Entretanto, evidências recentes sugerem que enquanto muitas células permanecem móveis após a conservação, as suas membranas estão

desestabilizadas, reduzindo a sobrevivência por impossibilidade de resistir ao envelhecimento no trato genital feminino após inseminação cervical (MAXWELL e WATSON, 1996).

Os resultados de fertilidade obtidos com sêmen refrigerado, por via cervical, são bastante heterogêneos: 0 a 61,7% (MIES FILHO e RAMOS, 1954); 9,7 a 50,0% (MARTIN e WATSON, 1976); 0 a 27,1% (WATSON e MARTIN, 1976); 51,4 a 61,7% (CARMENATE e GAMCIK, 1982).

Resultados em 10 anos de pesquisa em inseminação artificial cervical, com sêmen refrigerado a 15°C na França, demonstraram variações de 50,0 a 79,0% de fertilidade nas diferentes condições observadas (AGUER *et al.*, 1992).

Além do local de deposição do sêmen, provavelmente a heterogeneidade das taxas de fertilidade se deva a inúmeros outros fatores que envolvem a inseminação artificial como: dose inseminante, qualidade dos espermatozoides, estro natural ou sincronizado, situação reprodutiva, idade, raça e condição corporal dos reprodutores e matrizes, intervalo entre o último parto e a inseminação, estação e momento de inseminação e inseminadores (CHEMINEAU e COGNIÉ, 1991; e LÓPEZ-BREA, 1996).

Um dos maiores obstáculos para melhorar a fertilidade na inseminação artificial em ovinos é a impossibilidade de introdução de uma pipeta de inseminação através da cérvix da ovelha, seja por seu formato tortuoso ou impossibilidade de fixação pelo reto (HALBERT *et al.*, 1990). O canal cervical, estrutura consistente, de forma afunilada, possui dobras colocadas excentricamente que diminuem de espessura à medida que se aproximam do corpo do útero (SOUZA, 1994). Tentativas para superar o problema da barreira cervical têm sido feitas utilizando deposição intra-uterina do sêmen por laparoscopia (KILLEN e CAFFERY, 1982), aumentando a profundidade de deposição no canal cervical (SALAMON e LIGHTFOOT, 1970) ou por métodos de inseminação transcervical com diferentes tipos de aplicadores (HALBERT *et al.*, 1990; EPPLESTON *et al.*, 1994) e tração cervical (SOUZA, 1993).

O nível de fertilidade com aplicação exocervical oscila entre 35 a 70% e no caso de inseminação intra-uterina sobe para 50 a 80% (LÓPEZ-BREA, 1996).

SALAMON *et al.*, (1977) trabalhando com sêmen refrigerado por 2 dias a 5°C em diluente TRIS, obtiveram 94,4% de óvulos fertilizados em inseminação intra-uterina por laparotomia e 40% de fertilização quando foi utilizada a via cervical. Quando empregou-se o sêmen refrigerado por 4 dias, nas mesmas condições, as taxas de fertilização foram de 91,3% para inseminação intra-uterina e 0% para inseminação cervical. Resultados discrepantes foram encontrados por SMITH *et al.*, (1978) que ao utilizarem sêmen refrigerado em diluente leite por 12 horas, alcançaram 58,4% de taxa de parição com o aplicador de Cassou para inseminação cervical profunda, contra 72,9% quando se utilizou aplicador para inseminação cervical superficial.

2.5 INFLUÊNCIA DO HORÁRIO DA INSEMINAÇÃO

O horário da inseminação em relação ao momento da ovulação é um dos mais importantes fatores que afetam a taxa de concepção (EPPLESTON e ROBERTS, 1986).

Segundo MILLER (1986) a ovulação ocorre aproximadamente 30 horas após o início do estro. Os óvulos sobrevivem de 4 a 10 horas nos ovidutos e os espermatozóides necessitam de algumas horas para capacitação, sendo portanto o melhor momento para a inseminação 12 a 24 horas após o início do estro.

HUNTER *et al.*, (1982), trabalhando com ovelhas cara-negra, observaram incremento do transporte espermático até os ovidutos quando a monta era realizada no segundo dia de estro, ou seja, mais próximo do momento da ovulação. A taxa de fertilização foi de 20% quando a monta era realizada no momento inicial do estro e de 94,4% se a monta acontecia

24 horas mais tarde.

Porém, JONES *et al.*, (1969), estudando o momento da inseminação cervical com sêmen refrigerado em relação ao estágio do estro natural, verificaram que a fertilidade das ovelhas foi mais elevada durante as primeiras 12 horas do estro e reduziu-se progressivamente nos dois períodos subsequentes de 12 horas. Esses resultados confirmam os dados de MATTNER e BRADEN (1969), que verificaram a presença de número significativamente maior de espermatozóides na cérvix, útero e ovidutos quando a inseminação era realizada no início do estro.

A inseminação artificial com estro natural é amplamente utilizada em rebanhos numerosos, porém para que a inseminação seja prática e economicamente viável em pequenos rebanhos, é necessário que todas as fêmeas apresentem estro em momento de elevada coincidência. Para isto são utilizados métodos naturais e/ou artificiais de indução ou sincronização de estro.

Em ovelhas com estro sincronizado, a ovulação ocorre mais precocemente, em relação ao início do estro, do que em ovelhas ciclando naturalmente (LUNSTRA e CHRISTENSON, 1981).

Na sincronização com progestágenos em conjunto com Gonadotrofina Coriônica Equina (eCG) e efeito macho, a maioria das ovelhas apresenta estro em 36 a 48 horas e ovula aproximadamente 60 horas após a retirada dos pessários (EVANS e MAXWELL, 1987), havendo variações conforme a raça (SALAMON e MAXWELL, 1995). SOUZA *et al.*, (1995), verificaram em ovelhas Corriedale, que a ovulação ocorre 65,1 horas após a retirada de esponjas impregnadas com acetato de medroxiprogesterona (MAP) e aplicação do eCG em ovelhas expostas aos carneiros. O mesmo tratamento hormonal na ausência do macho resultou em ovulação 73,5 horas após a retirada das esponjas e aplicação do eCG.

Em esquemas comerciais de inseminação artificial, preconiza-se o uso de um horário fixo de inseminação após a sincronização do estro com o objetivo de maximizar o aproveitamento do sêmen e facilitar o manejo dos

animais, evitando a supervisão constante para a identificação do momento em que as fêmeas apresentam estro (DZIUK *et al.*, 1972).

Com relação ao horário de inseminação, após a retirada dos pessários e aplicação do eCG, EVANS e MAXWELL (1987) sugerem, para a raça Merino Australiano, o horário de 55 horas e 60 a 66 horas, para uma única inseminação artificial cervical e intra-uterina por laparoscopia, respectivamente. CHEMINEAU e COGNIÉ (1991) trabalhando com raças francesas preconizam 55 ± 1 horas para inseminação cervical e 60 a 72 horas para a intra-uterina.

O tipo de progestágeno usado tem um efeito significativo sobre a taxa de parição (EPPLESTON e ROBERTS, 1986). Há significativa vantagem pelo uso do Acetato de Fluogestona (FGA) em relação ao Acetato de Medroxiprogesterona (MAP) quando se utilizam horários fixos de inseminação após a remoção das esponjas (55 ± 1 h). A explicação mais provável é que o FGA promove sincronização de estro mais precisa ou este horário de inseminação não é adequado para animais tratados com MAP. Para que os resultados sejam satisfatórios é necessário precisar o horário da inseminação, uma vez que o tratamento com progestágenos e eCG reduz o mecanismo de transporte e a sobrevivência dos espermatozóides no trato genital da fêmea (CHEMINEAU e COGNIÉ, 1991). Determina, ainda, aumento na taxa de mortalidade embrionária qualquer que seja a estação do ano em que o estro é induzido (LUNSTRA e CHRISTENSON, 1981).

Com referência ao horário de inseminação intra-uterina em ovelhas que tiveram o estro sincronizado, EPPLESTON e ROBERTS (1986), obtiveram taxas de parição de 31,7; 61,5 e 37% para inseminações com sêmen congelado, realizadas por laparoscopia às 48, 60 e 72 horas respectivamente após a retirada dos pessários impregnados com MAP.

Em ovelhas superovuladas, não houve diferença na taxa de fertilização de óvulos entre inseminações intra-uterinas às 24, 44 e 64 horas após a retirada dos pessários quando se utilizou sêmen fresco

diluído. Porém, utilizando sêmen congelado, os resultados foram superiores às 44 horas em relação às 24 e 64 horas (EVANS *et al.*, 1986).

MACHADO e SIMPLÍCIO (1990), verificaram taxas de não retorno ao estro superiores quando a inseminação intra-uterina com sêmen congelado era realizada às 46 horas após a sincronização de estro com MAP e cloprostenol em relação às inseminações executadas às 38 ou 54 horas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AVALIAÇÃO DOS DILUENTES

3.1.1 Animais

Foram utilizados como doadores de sêmen, 3 carneiros da raça Suffolk, com idade variando entre 3 e 6 anos, submetidos a exame andrológico. Os animais encontravam-se na Fazenda Experimental do Canguiri pertencente à Universidade Federal do Paraná, localizada no Município de Pinhais (PR). Os animais apresentavam escore da condição corporal 4, sendo mantidos em confinamento e alimentados com silagem de milho, concentrado e sal mineral.

3.1.2 Colheita e avaliação do sêmen fresco

O sêmen foi obtido com vagina artificial¹, sendo os 3 carneiros utilizados em sistema de rodízio. Durante 4 dias da semana era colhido um ejaculado de 2 carneiros, totalizando 2 ou 3 colheitas semanais de cada reprodutor. Os ejaculados foram obtidos nos meses de janeiro, fevereiro e maio de 1996, estando os animais em descanso sexual.

Imediatamente após a colheita as amostras foram colocadas em banho-maria a 30°C e examinadas conforme os critérios:

a) Volume

O volume foi medido por meio de pipeta graduada.

b) Turbilhonamento

Uma gota de sêmen puro foi colocada, por meio de uma pipeta

¹ Metalúrgica Walmur – Porto Alegre - RS

Pasteur, sobre lâmina aquecida a 37°C. Utilizou-se microscópio binocular² (40X) com platina aquecedora para a avaliação dos resultados que eram expressos de acordo com escala de valorização de 0 a 5, segundo EVANS e MAXWELL (1987).

c) Motilidade progressiva

Uma gota de sêmen fresco foi colocada em um tubo de ensaio com 0,5 ml de solução fisiológica. A seguir uma gota deste homogeneizado era colocada entre lâmina e lamínula, aquecidas a 37°C para avaliação microscópica (100X), sendo o resultado expresso em percentual.

d) Vigor

Simultaneamente à determinação da motilidade progressiva, avaliou-se o vigor, sendo o resultado expresso em escala de 0 a 5 (CHEMINEAU e COGNIÉ, 1991)

e) Concentração espermática

Esta característica foi estimada segundo relatos de EVANS e MAXWELL (1987) que estimam a concentração espermática conforme a consistência do ejaculado.

f) Morfologia espermática

Imediatamente após a homogeneização dos ejaculados, uma gota era colocada em 1 ml de solução formol – citrato³. Estas amostras eram mantidas sob refrigeração até o momento do exame.

Para a preparação das lâminas era colocada uma gota do sêmen conservado na solução formol-citrato entre lâmina e lamínula, fixadas nas laterais por esmalte incolor, e eram contadas 200 células por lâmina

²Ernest Leitz Wetzlar HM-LUX 3 - Germany

³ Solução mãe: citrato de sódio..... 29 g
 H2O d. 1000 ml
 Solução final: solução mãe..... 960 ml
 Formol 40%..... 40 ml

em microscópio de contraste de fase⁴ (1000 X). Os defeitos foram classificados segundo BLOM (1973) em maiores e menores, conforme tabela 2.

TABELA 2 - Classificação das anormalidades espermáticas.

DEFEITOS MAIORES	DEFEITOS MENORES
- subdesenvolvido	- cabeça estreita
- formas teratológicas	- cabeça pequena normal
- acrossoma (knobbed)	- cabeça gigante ou larga
- diadema (pouch formation)	- cabeça isolada normal
- cabeça piriforme	- acrossoma desprendido
- cabeça estreita na base	- implantação abaxial
- cabeça pequena anormal	- cauda enrolada
- cabeça isolada anormal	- outras elementos:
- peça intermediária em sacarrolha	- medusas
- outros defeitos de peça intermediária	- células primordiais
- gota proximal	- células gigantes
- pseudogota	- leucócitos
- cauda fortemente dobrada	- hemácias
	- células epiteliais

Fonte: Blom, 1973.

Foram aproveitados somente os ejaculados que possuíam no mínimo volume de 0,7 ml, 70% de motilidade progressiva, turbilhonamento 3, vigor 3, concentração espermática de 2,5 milhões/mm³ e 80% de espermatozóides normais.

3.1.3 Preparação dos diluentes

Foram testados os diluentes CUE, CU-16, glicina-gema, citrato-gema, leite UHT-gema, TRIS-gema, **ver** anexo 1.

Os diluentes eram preparados semanalmente, armazenados em refrigerador a 5°C e utilizados até 4 dias após a preparação.

Os sais foram pesados em balança eletrônica digital, acrescidos de água deionizada tridestilada e 1,0 mg de estreptomicina mais 1000 UI de penicilina/ml e submetidos a filtragem em Sterile Acrodisc⁵. A gema de ovo foi acrescentada no momento da diluição.

⁴ Meiji Techno CO., LTD. ML 5000 Microscope – Japan.

⁵ Sterile Acrodisc, product nº 4192: Gelman Sciences, Michiga USA.

3.1.4 Refrigeração do sêmen

Após a avaliação seminal, foram misturados 0,7 ml de cada ejaculado, constituindo um homogeneizado de 1,4 ml. Diluíam-se lentamente 0,6 ml de cada um dos 6 diluentes a serem testados em 0,2 ml do homogeneizado (proporção de 1:3), em tubos de ensaio no banho-maria a 30°C. Os tubos de ensaio tampados eram colocados em recipiente plástico, contendo água do banho-maria. Este conjunto era levado à caixa de isopor 16 x 16 x 18 cm que continha 800 ml de água sob forma de cubos de gelo. A refrigeração para atingir 5°C era feita gradualmente em 2 horas, correspondendo à diminuição progressiva de 0,21°C/min. O esquema de refrigeração está representado na figura 1.

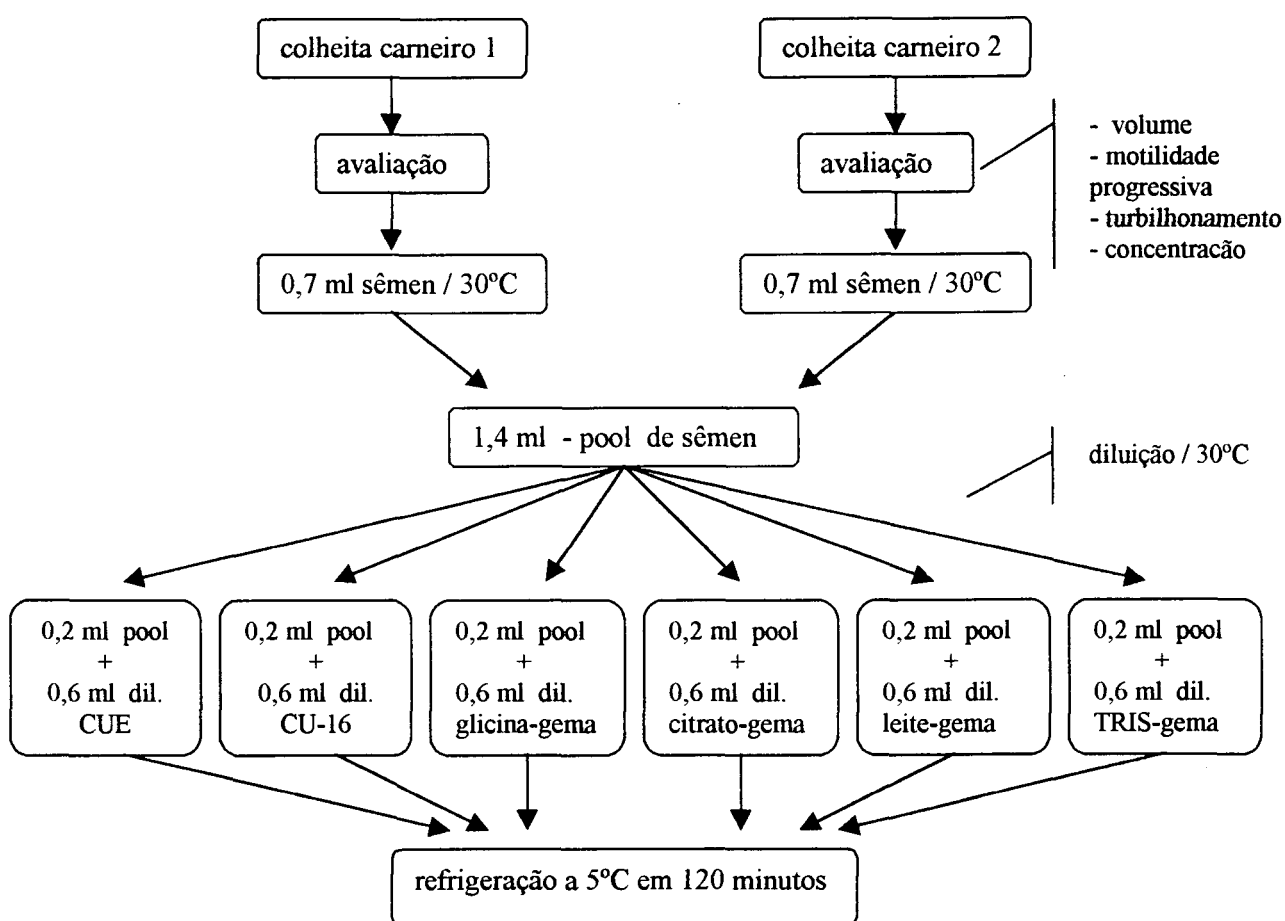


FIGURA1- Esquema da metodologia utilizada para refrigeração do sêmen.

3.1.5 Avaliação do sêmen refrigerado

Foram avaliadas 23 alíquotas do homogeneizado de sêmen, 8 horas após o início da refrigeração em cada um dos 6 diluentes. Sete destas 23 amostras foram submetidas ao TT, colocando-se 0,5 ml do sêmen refrigerado em tubos de ensaio com tampa, para a incubação a 38°C em banho maria. As amostras foram avaliadas a cada hora durante 4 horas.

Tanto para o sêmen refrigerado como para o teste de termo resistência lento procedeu-se a avaliação de:

- a) Turbilhonamento, conforme descrito no item 3.1.2 d, com o seguinte detalhe: por se tratar de sêmen refrigerado, as amostras foram aquecidas a 37°C durante 1 minuto, em placa aquecedora, antes de serem avaliadas ao microscópio.
- b) Motilidade progressiva e vigor. O material foi preparado conforme descrito nos itens 3.1.2 c e 3.1.2 d sendo colocadas 2 gotas de sêmen refrigerado em 0,5 ml do diluente correspondente, sem a gema de ovo, no banho-maria a 37°C por 1 minuto anteriormente a avaliação.
- c) Morfologia espermática. Foram colhidas 3 gotas das amostras de sêmen após 8 horas de refrigeração, que foram diluídas em 1 ml de solução de formol-citrato. Procedeu-se a avaliação conforme item 3.1.2 f.

3.2 COLHEITA E DILUIÇÃO DO SÊMEN PARA A INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL

Em cada inseminação artificial foi utilizado um *pool* de sêmen de 2 carneiros, de um total de 4 animais da raça Suffolk, com idade de 2 a 6 anos, previamente submetidos a exame andrológico.

Os ejaculados foram colhidos mediante vagina artificial, avaliados,

homogeneizados, diluídos e refrigerados conforme nos itens 3.1.2 e 3.1.4.

As amostras de sêmen foram divididas em 2 alíquotas e diluídas nos diluentes CUE e citrato-gema.

Somente foram utilizados ejaculados que apresentaram o mínimo de 70% de motilidade progressiva, turbilhonamento 3, vigor 3, concentração espermática de 2,5 milhões/mm³ e 80% de espermatozóides normais.

3.3 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL

A IA foi realizada nos meses de junho, julho de 1996 e março de 1997 em ovelhas submetidas a estro sincronizado.

3.3.1 Sincronização de estro

Todas as ovelhas tiveram o estro sincronizado utilizando-se pessários intravaginais⁶ impregnados com 50 mg de MAP, os quais permaneceram por 14 dias quando se administraram 500 UI de eCG⁶ e introduziram-se os rufiões junto às fêmeas.

3.3.2 Rufiões

Foram utilizados 5% de machos vasectomizados para cada grupo de ovelhas. Os rufiões foram previamente submetidos a exame dos ejaculados, colhidos por eletroejaculação. Diariamente recebiam tinta⁷ amarela ou vermelha na região peitoral para identificação das fêmeas em estro.

⁶ CIENTISTAS ASSOCIADOS – Produtos Biológicos. Rua Andrade Neves, 438. CEP: 96020-080. Pelotas – RS

⁷ XADREZ – Globo S/A Tintas e Pigmentos – Mauá – SP.

3.3.3 Fêmeas

Foram inseminadas 140 ovelhas mestiças da raça Suffolk, com idade de 2 a 6 anos, apresentando escores da condição corporal entre 3 e 4, alocadas em 2 Parques Municipais da Cidade de Curitiba (PR). Esses animais eram mantidos em regime semi-intensivo, permanecendo durante o dia em pastagem nativa e recebendo concentrado ao final da tarde quando eram recolhidas ao aprisco.

Todas as ovelhas utilizadas para a inseminação foram submetidas ao exame ginecológico prévio por meio de espéculo vaginal, sendo descartadas as que apresentavam constrição vaginal persistente ou catarro genital.

GRUPO 1: avaliação da taxa de prenhez após utilização de sêmen refrigerado por via intra-uterina.

Foram inseminadas 44 ovelhas, 55 ± 1 horas após a retirada dos pessários. Utilizou-se o laparoscópio para inseminação intra-uterina, segundo KILLEN e CAFFERY (1982) e NEVES e LUZ (1994), com sêmen refrigerado durante 8 a 10 horas a 5°C. A dose mínima inseminante foi de 125 milhões de espermatozóides, em volume de 0,2 ml, em cada corno uterino. As ovelhas foram divididas em 2 subgrupos:

Subgrupo 1A : 23 ovelhas foram inseminadas com sêmen refrigerado em CUE.

Subgrupo 1B : 21 ovelhas foram inseminadas com sêmen refrigerado em citrato-gema.

GRUPO 2: avaliação da taxa de prenhez após utilização de sêmen refrigerado por via cervical superficial.

Foram inseminadas 47 ovelhas, 49 ± 1 horas após a retirada dos pessários. Foi utilizado sêmen refrigerado durante 8 a 9 horas a 5°C, sendo empregada a técnica de inseminação cervical superficial, com

aplicador modelo BARRETO MIES⁸.

A contenção das fêmeas inseminadas foi realizada mediante elevação do posterior sobre cavalete de 90,0 cm de altura e imobilização dos membros pélvicos por um auxiliar. Mediante espéculo tubular⁸, localizava-se a abertura cervical e procedia-se a inseminação, permanecendo a ovelha, na mesma posição por mais um minuto. Nos animais que possuíam excesso de muco vaginal, este era retirado com o auxílio do espéculo. A dose mínima inseminante foi de 250 milhões de espermatozóides, em volume de 0,4 ml, por ovelha. As ovelhas foram divididas em 2 subgrupos:

Subgrupo 2A: foram inseminadas 24 ovelhas com sêmen refrigerado em CUE.

Subgrupo 2B: foram inseminadas 23 ovelhas com sêmen refrigerado em citrato-gema.

GRUPO 3: avaliação do índice de prenhez após utilização de sêmen refrigerado por via cervical superficial às 57 horas após a retirada dos pessários.

Foram inseminadas 34 ovelhas com sêmen refrigerado , 57 ± 1 horas após a retirada dos pessários. Foi utilizado sêmen refrigerado no diluente citrato-gema por 8 a 9 horas a temperatura de 5°C, sendo empregada a técnica de inseminação cervical superficial, conforme descrito para o grupo 2. A dose mínima inseminante foi de 250 milhões de espermatozóides, em volume de 0,4 ml, por ovelha.

⁸ Metalúrgica Walmur – Porto Alegre - RS

3.4 DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO

Foi realizado por exame ultra-sonográfico abdominal, utilizando-se transdutor 3,5 MHZ⁹, 60 dias após a inseminação artificial.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para poder efetuar as comparações entre sêmen fresco e sêmen refrigerado nos 6 diluentes e os diluentes entre si, utilizou-se a Técnica de Componentes Principais, através de uma combinação linear das 3 variáveis categóricas motilidade progressiva, vigor e turbilhonamento com o objetivo de ser obtida apenas uma variável resposta, a qual foi utilizada para as comparações desejadas. As variáveis obtidas pela Técnica de Componentes Principais foram combinadas linearmente, utilizando-se como pesos seus correspondentes autovalores, motilidade progressiva (F1), o turbilhonamento (F2) e o vigor (F3) :

$$\text{NOVA VARIÁVEL RESPOSTA} = 1.9908 * F1 + 0.6387 * F2 + 0.3705 * F3$$

Como as suposições residuais foram atendidas, para a avaliação do sêmen realizada após 8 horas de refrigeração, as variáveis de cada grupo foram submetidas à Técnica de Análise de Variância (ANOVA) e ao Teste de Comparação Múltipla de Tukey.

A comparação entre os diluentes na quarta hora do TT foi executada de forma semelhante àquela para a avaliação do sêmen refrigerado por 8 horas. Utilizou-se a Técnica de Componentes Principais obtendo-se uma única variável resposta para os resultados de motilidade progressiva (F1), turbilhonamento (F2) e vigor (F3):

⁹ Echo Camera ssd-210-DX 2. Aloka CO., LTD. Japan

$$\text{NOVA VARIÁVEL RESPOSTA (TT)} = 2.1460 \cdot F1 + 0.4397 \cdot F2 + 0.4143 \cdot F3$$

Novamente foram utilizadas a Técnica de Análise de Variâncias (ANOVA) e o Teste de Comparação Múltipla de Tukey após serem atendidas as suposições residuais confirmadas pelo Teste de Kolmogorov-Smirnov (valor-p=0.982966) e Teste de Bartlett (valor-p=0.0914187).

Todas as diferenças observadas em cada defeito estudado na morfologia espermática entre sêmen fresco e refrigerado foram submetidas a comparação por Análise de Variância (ANOVA) e ao Teste de Tukey.

O estudo dos resultados dos defeitos maiores atendeu as suposições exigidas pela técnica ANOVA sendo o valor-p = 0.80948 para o Teste de Kolmogorov-Smirnov e valor-p = 0.606866 para o Teste de Bartlett.

Quanto aos resultados de acrossoma desprendido o Teste de Kolmogorov-Smirnov proporcionou valor-p = 0.740299 e valor-p = 0.0971572 para o Teste de Bartlett, satisfazendo as exigências da técnica de ANOVA.

Os dados obtidos no defeito cauda enrolada atenderam às exigências de ANOVA para a normalidade dos resíduos, o Teste Kolmogorov-Smirnov proporcionou valor-p = 0.594795. Porém, quanto à suposição de homogeneidade de variâncias, o Teste de Bartlett resultou em valor-p = 0.00013. Desta forma optou-se pela transformação raiz quadrada dos resultados, recomendada quando a variância dos erros cresce proporcionalmente aos valores das observações. Considerando os dados transformados, novamente fez-se o Teste de Kolmogorov-Smirnov obtendo-se valor-p = 0.704654 e valor-p = 0.129918 para o Teste de Bartlett, indicando a homogeneidade das variâncias.

Os outros defeitos menores foram agrupados e satisfizeram as exigências da técnica de ANOVA com valor-p = 0.563425 para o Teste de

Kolmogorov-Smirnov e valor-p = 0.171453 para o Teste de Bartlett.

Os resultados de total de defeitos menores também foram submetidos aos testes de Kolmogorov-Smirnov e de Bartlett satisfazendo as exigências de ANOVA com valor-p = 0.794024 e valor-p = 0.072429 respectivamente.

Com relação às comparações das taxas de prenhez dos diferentes grupos de ovelhas inseminadas, utilizou-se o Teste Exato de Fisher para a verificação da possibilidade de se trabalhar com os dados referentes aos dois parques como sendo um.

Para a verificação das diferenças entre os grupos de ovelhas inseminadas, foram efetuadas comparações pela Proporção Binomial de Sucesso, pelo Teste Exato de Fisher e Teste χ^2 . Na comparação dos grupos o nível de significância foi fixado em 5%.

4 RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO SÊMEN REFRIGERADO

4.1.1 Avaliação 8 horas após refrigeração

Na tabela 3 são apresentados os resultados médios de motilidade progressiva, turbilhonamento e vigor de 23 amostras de sêmen fresco e posteriormente refrigeradas por 8 horas à temperatura de 5°C nos 6 diluentes testados.

TABELA 3 - Avaliação *in vitro* de sêmen ovino fresco e após 8 horas a refrigeração em 6 diluentes à temperatura de 5°C. Curitiba (PR), 1999.

DILUENTE	MOTILIDADE PROGRESSIVA (%)	TURBILHONAMENTO (0-5)	VIGOR (0-5)
sêmen fresco ^a	75,65	4,02	3,73
CUE* ^c	64,34	2,3	2,85
CU-16** ^c	61,73	2,21	2,94
glicina-gema ^d	55,22	1,06	2,42
citrato-gema ^b	55,22	2,64	2,74
leite UHT-gema ^c	67,82	1,98	2,8
TRIS-gema ^c	42,17	2,36	2,46

NOTA: letras diferentes indicam diferença estatística (P< 0,05)

* Cornell University Extender

** Cornell University - 16

Comparando-se a nova variável obtida pelo cálculo estatístico com o uso da Técnica Análise de Componentes Principais, proveniente das

características: motilidade progressiva, vigor e turbilhonamento, foram observadas diferenças significativas ($P < 0,05$) entre sêmen fresco e sêmen refrigerado. Observou-se superioridade de resultados do sêmen após 8 horas de refrigeração no diluente citrato-gema em relação aos demais nas características avaliadas. Os diluentes CUE, CU-16, leite UHT-gema, TRIS-gema não diferiram entre si e o diluente glicina-gema apresentou resultados inferiores aos demais.

4.1.2 Teste de termo-resistência

Ocorreu um pequeno aumento da motilidade progressiva na 1ª hora de incubação em 4 dos 6 diluentes utilizados, seguido por declínio progressivo em todas as amostras até o último momento de observação **ver** figura 1.

A melhor média de motilidade progressiva, observada na 4ª hora de incubação, foi de 50% para o diluente citrato-gema, seguida de 38,89% para o diluente CUE.

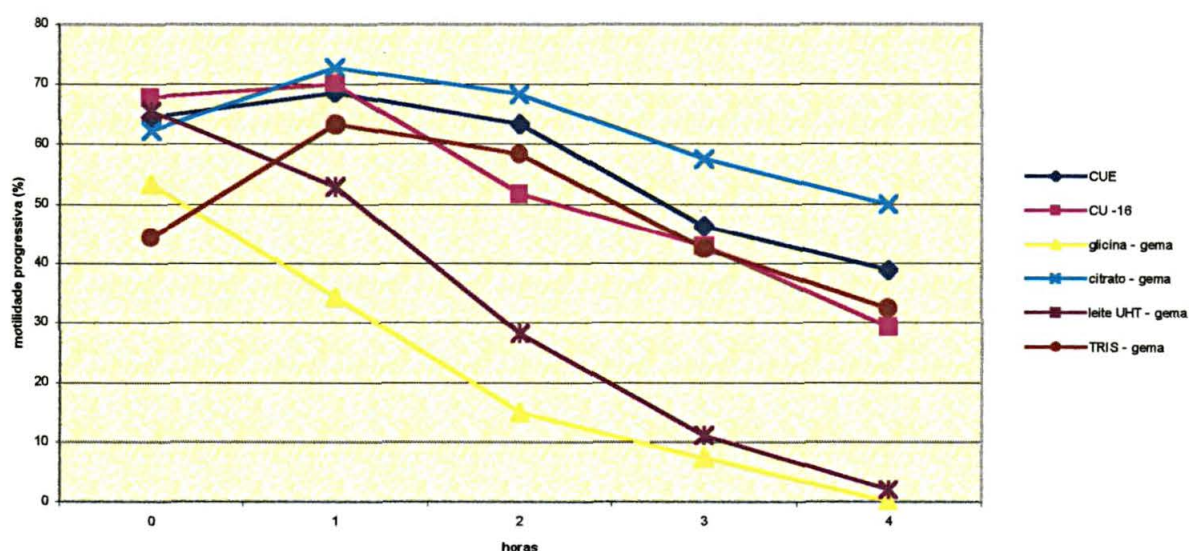


FIGURA 1 – Valores de motilidade progressiva (%) durante o TT de sêmen ovino refrigerado em 6 diluentes por 8 horas à temperatura de 5°C.

Os valores de vigor para cada um dos diluentes durante o TT estão representados na figura 2. Assim como na motilidade progressiva, houve declínio lento e contínuo do vigor em todas as amostras até o último momento de observação.

Os valores de turbilhonamento para cada um dos diluentes durante o TT, após refrigeração de 8 horas à temperatura de 5°C, estão representados na figura 3.

Observou-se repetição no comportamento de cada diluente, durante avaliação no TT para as características estudadas, ou seja, os 2 diluentes que mantiveram melhor motilidade progressiva também o fizeram para o vigor e conseqüentemente turbilhonamento.

Os valores de motilidade progressiva, turbilhonamento e vigor para cada um dos diluentes na 4ª hora do TT, após refrigeração de 8 horas à temperatura de 5°C, estão representados na tabela 4.

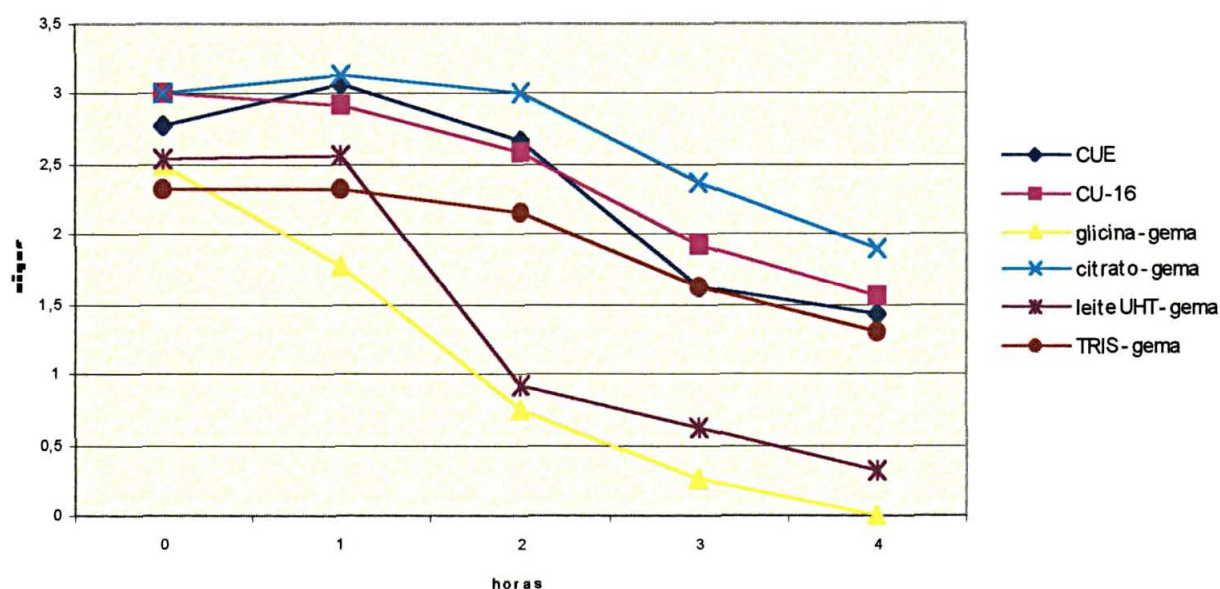


FIGURA 2 – Valores de vigor (0-5) durante o TT de sêmen ovino refrigerado em 6 diluentes por 8 horas à temperatura de 5°C.

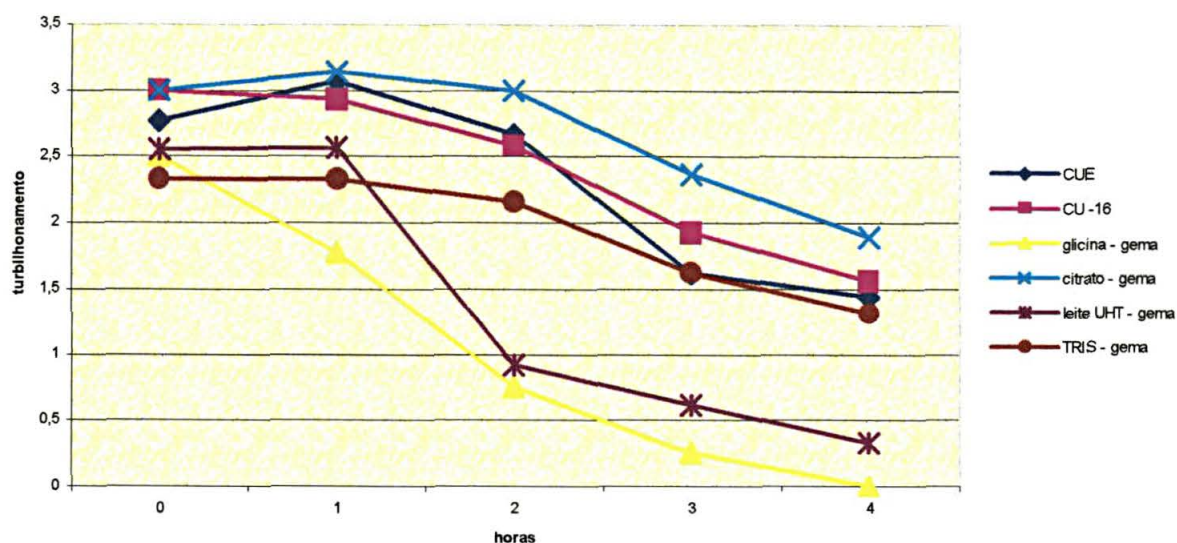


FIGURA 3 – Valores de turbilhonamento (0-5) durante TT de sêmen ovino refrigerado em 6 diluentes por 8 horas à temperatura de 5°C.

TABELA 4 - Valores de motilidade progressiva, turbilhonamento e vigor na 4ª hora do TT de sêmen ovino refrigerado em 6 diluentes por 8 horas à temperatura de 5°C. Curitiba (PR), 1999.

DILUENTE	MOTILIDADE PROGRESSIVA (%)	TURBILHONAMENTO (0-5)	VIGOR (0-5)
CUE* ^b	38,89	1,17	1,44
CU-16** ^b	29,37	1	1,56
glicina-gema ^c	0	0	0
citrato-gema ^a	50	1,5	1,89
leite UHT-gema ^c	2,2	0	0,33
TRIS-gema ^b	35	0,68	1,31
MÉDIA	25,49	0,72	1,08

NOTA: letras diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,05$)

* Cornell University Extender

** Cornell University - 16

Foram observadas diferenças significativas ($P < 0,05$) ao se comparar as avaliações na 4ª hora do TT. O sêmen diluído em citrato-gema demonstrou resultados estatisticamente superiores aos diluentes CUE, CU-16 e TRIS-gema. O sêmen diluído em leite UHT-gema e glicina-gema resultou em médias muito baixas de motilidade progressiva, turbilhonamento e vigor, as quais apresentaram-se com valor zero ou próximo a zero na 4ª hora de observação, evidenciando inferioridade de resultados quando comparados aos demais diluentes.

4.1.3 Avaliação da morfologia espermática

Com relação às características morfológicas dos espermatozóides refrigerados por 8 horas nos 6 diluentes testados quando comparados com sêmen fresco, não foi observado aumento significativo ($P > 0,05$) na percentagem de células que apresentaram defeitos maiores após a refrigeração em quaisquer dos diluentes testados, conforme está demonstrado na tabela 5.

Ao se analisar a percentagem total de defeitos menores, observou-se um aumento significativo ($P < 0,05$) de espermatozóides anormais após a refrigeração nos diluentes CU-16, leite UHT-gema e TRIS-gema em relação ao sêmen fresco, conforme demonstra a tabela 5. Os diluentes CUE, citrato-gema e glicina-gema não diferiram significativamente do sêmen fresco nem dos demais diluentes.

Considerando os defeitos menores que apareceram com maior frequência observou-se que o processo de refrigeração não afetou significativamente os resultados de percentagem de acrossoma desprendido, ($P > 0,05$) em todos os diluentes testados, conforme demonstra a tabela 5.

TABELA 5 - Avaliação da morfologia espermática em sêmen ovino fresco e refrigerado em 6 diluentes por 8 horas à temperatura de 5°C. Curitiba (PR), 1999.

DILUENTE	DEF. MENORES (%)				DEF. MAIORES (%)	TOTAL DEFEITOS (%)
	acrossoma desprendido	cauda enrolada	outros	TOTAL		
FRESCO	3,9 ^a	2,4 ^a	3,5 ^{ab}	9,8 ^a	3,1 ^a	12,9
CUE	4,7 ^a	9,2 ^{bc}	3,05 ^a	16,95 ^{ab}	3,4 ^a	20,35
CU-16	5,85 ^a	13,15 ^c	3,85 ^{ab}	22,85 ^b	2,9 ^a	25,75
glicina-gema	5,75 ^a	4,05 ^{ab}	6,1 ^b	15,9 ^{ab}	3,9 ^a	19,8
citrato-gema	6,1 ^a	7,55 ^{bc}	3,8 ^{ab}	17,45 ^{ab}	2,95 ^a	20,3
leite UHT-gema	4,9 ^a	9,45 ^{bc}	4,05 ^{ab}	18,4 ^b	3,15 ^a	21,55
TRIS-gema	5,1 ^a	9,1 ^{bc}	5,2 ^{ab}	19,4 ^b	3,05 ^a	22,45

NOTA: letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística significativa ($P < 0,05$).

A análise dos valores obtidos para o defeito menor - cauda enrolada demonstrou que há diferenças significativas entre as amostras de sêmen fresco e diluídas nos 6 conservantes testados ($P < 0,05$). Observou-se que o sêmen fresco apresenta a menor proporção de defeito cauda enrolada, diferindo de todos os diluentes, à exceção do diluente glicina-gema. O diluente CU-16 apresenta a maior proporção do referido defeito, sendo que tal diluente só difere do sêmen fresco e do diluente glicina-gema. Os demais diluentes citrato-gema, TRIS-gema, CUE e leite UHT-gema não apresentam diferenças entre si.

Os resultados referentes aos outros defeitos menores (cabeça estreita, cabeça pequena normal, cabeça gigante ou larga, cabeça isolada normal e implantação abaxial) foram agrupados e analisados em conjunto. Entre os defeitos que foram agrupados, o defeito que apareceu com maior frequência foi cabeça isolada normal, principalmente no sêmen diluído em glicina-gema, que se apresentou significativamente inferior às amostras diluídas em CUE ($P < 0,05$). Os demais diluentes e o sêmen fresco não

apresentaram diferenças significativas entre si, conforme verifica-se na tabela 5.

Em função dos resultados demonstrados *in vitro* foram escolhidos os diluentes que apresentaram melhores condições de preservabilidade do sêmen refrigerado. Utilizou-se citrato-gema e CUE para verificar a taxa de prenhez de ovelhas inseminadas com diferentes técnicas e em 2 horários diferentes.

4.2 TAXAS DE PREENHEZ APÓS INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL

Uma vez que a IA em cada grupo experimental foi realizada em 2 parques distintos, utilizou-se o Teste Exato de Fisher e verificou-se que não houve diferença significativa ($P>0,05$) entre os resultados obtidos para os mesmos grupos entre os 2 parques. Por esta razão os dados foram analisados em conjunto.

As taxas de prenhez de ovelhas inseminadas por via intra-uterina ou cervical com sêmen refrigerado diluído em CUE comparados com o sêmen diluído em citrato-gema são apresentados nas tabelas 6 e 7.

TABELA 6 - Taxas de prenhez de ovelhas inseminadas por via intra-uterina com sêmen refrigerado em 2 diluentes por 8 a 10 horas à temperatura de 5°C. Curitiba (PR), 1999.

DILUENTES	OVELHAS INSEMINADAS (Nº)	OVELHAS GESTANTES (Nº)	OVELHAS GESTANTES (%)
CUE*	23	16	69,56 ^a
Citrato-gema	21	18	85,71 ^a
TOTAL	44	34	77,27

NOTAS: letras iguais indicam que não houve diferença estatística ($P>0,05$).

* Cornell University Extender

TABELA 7 – Taxas de prenhez de ovelhas inseminadas por via cervical com sêmen refrigerado em 2 diluentes por 8 horas à temperatura de 5°C. Curitiba (PR), 1999.

DILUENTES	OVELHAS INSEMINADAS (Nº)	OVELHAS GESTANTES (Nº)	OVELHAS GESTANTES (%)
CUE*	24	02	8,33 ^a
Citrato-gema	23	05	21,74 ^a
TOTAL	47	07	14,89

NOTAS: letras iguais indicam que não houve diferença estatística ($P > 0,05$).

* Cornell University Extender

Apesar da taxa de prenhez ter sido superior no grupo inseminado com sêmen refrigerado no diluente citrato-gema, não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os 2 diluentes nessas vias de inseminação.

Na tabela 8 comparam-se os resultados da inseminação pela via intra-uterina e cervical, utilizando-se sêmen refrigerado em citrato-gema e variando-se o momento de inseminação para a via cervical. Considerando o local de deposição do sêmen, foi observada diferença estatística significativa entre os 2 grupos, utilizando-se o Teste Qui Quadrado. Os resultados de prenhez do grupo de ovelhas inseminadas pela via intra-uterina ($P < 0,05$) foram superiores.

Variando-se o momento de inseminação, na via cervical, após a retirada dos pessários, verificou-se que o grupo inseminado às 57 ± 1 horas apresentou resultados superiores de fertilidade ($P < 0,05$) quando comparados aos resultados de prenhez do grupo inseminado às 49 ± 1 horas, utilizando-se a Proporção Binomial de Sucesso.

TABELA 8 – Taxas de prenhez de ovelhas inseminadas com sêmen refrigerado em citrato-gema à temperatura de 5°C, considerando o local de deposição do sêmen e o momento de inseminação. Curitiba (PR), 1999.

LOCAL DE DEPOSIÇÃO DO SÊMEN	MOMENTO DE INSEMINAÇÃO* (HORAS)	OVELHAS INSEMINADAS (Nº)	OVELHAS GESTANTES (Nº)	OVELHAS GESTANTES (%)
Útero	55 ± 1	21	18	85,71 ^a
Cérvice	57 ± 1	32	14	43,75 ^b
Cérvice	49 ± 1	23	05	21,74 ^c

NOTAS: letras diferentes indicam diferença significativa (P<0,05)

* número de horas entre a retirada dos pessários e a inseminação

5 DISCUSSÃO

Na tentativa de minimizar as alterações provocadas no sêmen, durante o processo de preservação, são acrescidas soluções conservantes que proporcionam condições para a estocagem dos espermatozóides (CÓRDOVA *et al.*, 1989).

Verificou-se neste estudo, que o processo de refrigeração causou diminuição significativa na qualidade espermática, independente do diluente utilizado, quando comparado ao sêmen fresco. Segundo SALAMON e MAXWELL (1995), a redução e aumento na temperatura, assim como a manipulação do sêmen durante o processo de conservação promovem inevitavelmente redução na motilidade e causam danos ultraestruturais, bioquímicos e funcionais nos espermatozóides.

Foi possível verificar na avaliação *in vitro*, diferenças entre os diluentes testados quanto a capacidade de conservação do sêmen ovino, 8 horas após o início da refrigeração. Entretanto, PETRUZZI *et al.*, (1976), não encontraram diferenças na motilidade entre as amostras de sêmen diluídas em TRIS, citrato-gema e leite com ou sem gema, fazendo avaliações 4 horas após a refrigeração.

O sêmen diluído em citrato-gema demonstrou melhores resultados nas características avaliadas (motilidade progressiva + vigor + turbilhonamento) após 8 horas de refrigeração em relação aos demais diluentes testados. Estes dados confirmam os resultados de DAUZIER *et al.*, (1954) que verificaram maior longevidade dos espermatozóides diluídos em soluções de citrato quando comparados com leite. PETRUZZI *et al.*, (1976), verificaram maior motilidade, após 24 horas de refrigeração, em sêmen diluído com citrato-gema e diluído em TRIS em relação aos diluentes a base de leite. Apesar destes autores terem notificado uma semelhança entre os diluentes citrato-gema e TRIS na avaliação às 24 horas de conservação, a característica avaliada foi

motilidade total, ao invés de motilidade progressiva, vigor e turbilhonamento como realizou-se neste experimento.

As amostras de sêmen diluídas em CUE, CU-16, leite UHT-gema e TRIS-gema, não apresentaram diferença estatística significativa quando comparadas entre si na avaliação 8 horas após a refrigeração, porém demonstraram ser inferiores a aquelas diluídas em citrato-gema, nas características avaliadas. DEKA e RAO, (1980a), obtiveram motilidade progressiva superior em sêmen ovino diluído em TRIS-gema e leite integral em relação ao diluente citrato-gema, porém as amostras diluídas em citrato-gema, mantiveram mais que 50% da motilidade progressiva inicial após 72 horas de conservação. Nesse estudo as avaliações foram feitas somente 24 horas após a refrigeração e baseadas unicamente em motilidade progressiva.

Os diluentes que continham glicina em sua formulação (CUE, CU-16 e glicina-gema) não apresentaram vantagens significativas, nas características avaliadas, em relação aos demais diluentes testados. Porém SCHINDLER e AMIR (1961) observaram maior longevidade dos espermatozóides nos diluentes acrescidos de glicina. FLIPSE e ALMQUIST (1956) explicam que a maior vantagem da glicina é prolongar o tempo de conservação e que esta pode até reduzir a motilidade durante os primeiros 7 dias de conservação.

O diluente glicina-gema apresentou resultados inferiores aos demais diluentes nas observações realizadas 8 horas após a refrigeração e durante o TT. Esses dados confirmam os resultados de FOOTE e BRATON (1960) que, com sêmen bovino, verificaram motilidade inferior do diluente glicina-gema, principalmente se comparado ao diluente CUE e CU-16. Porém AHMED (1955) utilizando sêmen ovino refrigerado a 4°C, por até 17 dias, observou escores de motilidade superiores e o dobro do tempo de sobrevivência dos espermatozóides diluídos em glicina-gema, quando comparados aos diluídos em citrato-gema. Esses resultados confirmam a vantagem de utilizar diluentes acrescidos de glicina quando

se deseja a conservação do sêmen refrigerado por tempo prolongado. No uso por períodos curtos de conservação, como as 8 horas utilizadas neste experimento, não se observou melhora significativa da qualidade espermática quando comparada com os demais diluentes testados.

A avaliação dos diluentes no TT revelou não haver alteração nas médias de motilidade progressiva, vigor e turbilhonamento na 1ª hora de incubação, porém nas 3 horas subseqüentes ocorreu um declínio médio por hora de 11,6%; 0,52 e 0,42 na motilidade progressiva, vigor e turbilhonamento respectivamente, demonstrando uma diminuição lenta, progressiva e linear na média de todas as características avaliadas nos 6 diluentes testados até a última observação, a qual foi realizada na 4ª hora de incubação. Estes resultados concordam com as avaliações feitas por PAGANINI *et al.*, (1997) os quais obtiveram declínio linear significativo com o avanço do período de estocagem durante o teste de exaustão. Este fato pode ser explicado em função dos espermatozóides utilizarem mais os seus substratos nutritivos e diminuírem sua viabilidade durante as 4 horas do teste.

Na 4ª hora de avaliação, verificou-se a morte de todos os espermatozóides diluídos em glicina-gema e apenas 2,2% de motilidade progressiva no diluente leite UHT-gema. O diluente citrato-gema manteve as amostras de sêmen em melhores condições que os demais diluentes, apresentando 50% de motilidade na quarta hora, enquanto que os diluentes CUE, CU-16 e TRIS mantiveram os espermatozóides em condições semelhantes e significativamente inferiores ao citrato-gema. PAGANINI *et al.*, (1997) não observaram diferenças significativas entre os diluentes testados (glicina-gema, glicina-leite-gema e gema-leite) na motilidade e vigor dos espermatozóides aos 240 minutos do teste.

Com os resultados do TT foi possível determinar, por meio da avaliação dos espermatozóides, a habilidade e capacidade de cada diluente em fornecer um meio de nutrição e manutenção do pH compatíveis com a sobrevivência dos espermatozóides em temperaturas

que não diminuem seu metabolismo. Conforme observou LUZ (1991) com sêmen congelado, há uma correlação entre a motilidade progressiva no TT e os resultados de fertilidade.

O estudo da morfologia espermática, após a refrigeração, demonstrou não haver aumento significativo na percentagem de defeitos maiores após a refrigeração do sêmen. Este resultado era esperado. Segundo BLOM (1973) os defeitos maiores estão associados a um suposto distúrbio na espermatogênese.

Observou-se aumento significativo na percentagem total de espermatozóides com defeitos menores após a refrigeração nos diluentes CU-16, leite UHT-gema e TRIS-gema em relação ao sêmen fresco. Porém não se verificaram diferenças entre os diluentes. Dentre os defeitos menores, o aumento de cauda enrolada foi uma das anormalidades que mais contribuiu para a diferença significativa entre os 3 diluentes acima citados em relação ao sêmen fresco. Foi significativo o aumento de cauda enrolada em todos os diluentes testados em relação ao sêmen fresco. PAGANINI et al., (1997) também verificaram aumento de anormalidades de cauda quando analisaram sêmen refrigerado submetido a 240 minutos ao teste de exaustão. Segundo BARTH e OKO (1989), o estresse térmico e a hiposmolaridade das soluções conservantes aumentam a proporção de defeitos de cauda, significativamente. DREVIUS (1963), verificou que soluções hipotônicas induziam os espermatozóides a movimentos natatórios muito intensivos e com o aumento da hipotonicidade, as caudas tornavam-se curvas e posteriormente espiraladas. Para a determinação da causa exata do aumento das caudas enroladas encontradas neste estudo, faz-se necessária a determinação da osmolaridade das soluções empregadas.

Quando se avaliou a percentagem de acrossoma desprendido não foram observadas diferenças significativas entre o sêmen fresco e o sêmen refrigerado. SAXENA e SINGH (1967) avaliando comprimento e largura de cabeças de espermatozóides conservados em leite-gema,

bicarbonato-gema, citrato-gema e CUE, não encontraram alterações significativas. Porém KARCHE *et al.*, (1976) observaram que após 72 horas de conservação do sêmen a 5°C nos diluentes testados (citrato, leite integral e glicina), os espermatozóides apresentavam diminuição significativa do tamanho da cabeça em relação ao sêmen fresco, sendo no diluente glicina-gema mais evidente. Esta alteração foi atribuída a uma contração do acrossoma. As diferenças de resultados deste experimento com o supra citado podem ter ocorrido devido aos diferentes tempos de preservação estudados.

PAGANINI *et al.*, (1997) também observaram aumento nos defeitos de acrossoma em sêmen refrigerado, porém as amostras foram avaliadas na 4ª hora do TT, enquanto que neste experimento avaliou-se o sêmen fresco e 8 horas após a refrigeração.

Os outros defeitos menores foram agrupados e observou-se aumento significativo de anormalidades no sêmen diluído em glicina-gema (6,1%) quando comparado ao CUE (3,05%). Esta diferença ocorreu principalmente devido ao aumento de cabeças isoladas verificadas nos espermatozóides conservados em glicina-gema.

Apesar da sensível diminuição da qualidade espermática após o processo de refrigeração, no momento da inseminação, o sêmen apresentava-se em boas condições de motilidade progressiva, vigor e morfologia espermática. Porém MARTIN (1968) e MAXWELL e WATSON (1996) explicam que após a diluição e refrigeração, alguns danos provocados nas células espermáticas não afetam significativamente a motilidade, mas interferem seriamente na sobrevivência e capacidade fecundante dos espermatozóides no trato genital feminino.

Avaliando sêmen ovino após a descongelação, SALAMON e MAXWELL, (1995) verificaram que embora uma alta proporção (40-60%) de espermatozóides de carneiro preservaram a motilidade, somente 20 a 30% permaneceram biologicamente sem danos (físicos, bioquímicos ou funcionais). Um espermatozóide pode estar móvel, mas danificado,

portanto será improvável que penetre no óvulo e o fertilize.

Conforme os resultados dos estudos *in vitro* dos 6 diluentes testados, foram escolhidos os 2 conservantes que apresentaram as melhores classificações nas características avaliadas. Citrato-gema e CUE serviram como diluentes para verificar a taxa de prenhez de ovelhas inseminadas por via intra-uterina e cervical superficial e em diferentes horários após a retirada dos pessários.

Todas as ovelhas submetidas à sincronização de estro foram inseminadas, independente da exteriorização dos sinais de estro. Segundo MAXWELL (1986) não há diferença na fertilidade de ovelhas que manifestam ou não estro após o tratamento hormonal, porém LUZ (1991) encontrou 51,19% contra 15,20% de fertilidade para grupos que manifestaram e não manifestaram estro, respectivamente.

Os resultados de prenhez nas ovelhas inseminadas com sêmen refrigerado, verificados neste experimento, variaram de 8,33 a 85,71% conforme o tipo de diluente, o horário de inseminação e principalmente o local de deposição do sêmen. Para CHEMINEAU e COGNIÉ (1991) e LÓPEZ-BREA, (1996) este elevado grau de variabilidade dos resultados de fertilidade, ocorre não somente em função das características estudadas neste experimento, mas também devido aos inúmeros fatores que estão envolvidos no processo da inseminação como: situação reprodutiva, idade, raça, condição corporal dos reprodutores e matrizes, dose inseminante, utilização de estro natural ou sincronizado, intervalo entre o último parto e a inseminação, estação do ano, momento de inseminação e inseminadores, assim como à qualidade do sêmen, que pode variar de um carneiro para outro ou entre ejaculados do mesmo carneiro (LAPWOOD *et al.*, 1972; MARTIN e WATSON, 1976).

Durante a avaliação *in vivo* dos diluentes, verificou-se maior número de ovelhas gestantes após inseminação com citrato em relação ao CUE, tanto na via intra-uterina quanto na via cervical superficial, porém a diferença não foi estatisticamente significativa ($P > 0,05$).

Os resultados de prenhez no grupo de ovelhas inseminadas por via intra-uterina com sêmen refrigerado foram satisfatórios para os 2 diluentes testados. Os grupos inseminados com sêmen diluído em CUE e citrato-gema apresentaram, respectivamente 69,56 e 85,71% de ovelhas gestantes (tabela 8). Apesar do diluente citrato-gema ter apresentado resultado 16,15% superior em relação ao grupo inseminado com CUE, não houve diferença significativa ($P>0,05$).

A taxa de prenhez foi baixa nos grupos inseminados por via cervical superficial, nos 2 diluentes testados, às 49 ± 1 hora após a retirada dos pessários, (tabela 9). A diferença no número de ovelhas gestantes de 8,33% para 21,74% no grupo inseminado com sêmen refrigerado em CUE e citrato-gema, respectivamente, demonstrou não haver diferença significativa ($P>0,05$) entre diluentes (tabela 7). O maior número de ovelhas gestantes após a inseminação com citrato-gema tanto por via cervical superficial quanto intra-uterina ($P>0,05$) sugere a utilização de maior número de animais a serem inseminados em cada grupo.

Os melhores resultados obtidos nos grupos que foram inseminados com sêmen refrigerado em diluente citrato-gema, demonstram que os resultados *in vivo* apresentaram coerência com os obtidos *in vitro*, onde verificou-se também melhor desempenho deste diluente.

Comparando-se os dados das taxas de prenhez com a utilização de citrato-gema entre 54 e 58 horas após a retirada dos pessários (tabela 10), alterando-se o local de deposição do sêmen, verificou-se que o grupo de ovelhas inseminadas por via cervical superficial apresentaram percentual de gestação de 43,75%. Essa taxa foi inferior ($P<0,05$) à 85,71% apresentados pelo grupo inseminado por via intra-uterina. Estes resultados confirmam os relatos de SOUZA (1993) e EPPLESTON *et al.*, (1994) os quais afirmam que o índice de fertilidade aumenta linearmente à medida que a inseminação se processa em maior profundidade no trato genital da ovelha.

O percentual de gestação de 85,71% no grupo de ovelhas que foram inseminadas na via intra-uterina por laparoscopia com sêmen refrigerado, foi satisfatório. Estes resultados concordam com os de LÓPEZ-BREA (1996), que obteve índices de 50 a 80% de fertilidade após inseminação intra-uterina. LUZ (1991) obteve 65,52% de gestações em inseminação por laparoscopia utilizando sêmen fresco.

A utilização da laparoscopia para a inseminação intra-uterina em ovinos torna a técnica mais onerosa e requer mais tempo e mão de obra para sua execução. Porém a vantagem é que quando o problema da barreira cervical é resolvido não há diferença na fertilidade entre sêmen fresco e congelado, além de permitir a utilização de uma dose inseminante menor, quando comparado a inseminação cervical, otimizando o uso do doador do sêmen (FUKUI e ROBERTS, 1978). O uso da inseminação intra-uterina pode estender a vida útil do sêmen refrigerado para até 6 dias de estocagem (EVANS, 1987). SALAMON *et al.*, (1977) utilizando inseminação intra-uterina por laparotomia, obtiveram 52,9% de óvulos fertilizados com sêmen conservado por 8 dias a 5°C em diluente TRIS.

Levando-se em consideração esses relatos e os resultados obtidos, testes subsequentes na inseminação intra-uterina com sêmen refrigerado poderão ser reproduzidos utilizando-se doses inseminantes menores e tempos maiores de conservação em relação aos utilizados neste experimento.

Apesar da literatura apresentar alguns bons resultados de fertilidade com o uso de sêmen refrigerado utilizado por via cervical como no trabalho de LANGFORD *et al.* (1979), onde foram verificados índices de parição de 78% com dupla inseminação e utilizando 720×10^6 espermatozóides, comumente os índices de fertilidade são pobres como aqueles encontrados por WATSON e MARTIN (1976) 0 a 27,1%, BUTSWAT *et al.*, (1990) 11,1 a 38,9% e CRUZ (1994) 7,4 a 11,11% em seus experimentos. As baixas taxas de fertilidade utilizando-se sêmen

conservado via cervical em ovinos, têm sido objeto de estudos em vários países (FUKUI e ROBERTS, 1978; HALBERT, *et al.*, 1990; EPPLESTON, *et al.*, 1994) e muitas vezes os baixos resultados encontrados chegam a comprometer a viabilidade de seu emprego (LÓPEZ-BREA, 1996).

PLATOV **apud** SALAMON e MAXWELL (1995), baseado em informações da literatura e classificando a probabilidade de penetração do espermatozóide no sítio de fertilização do óvulo em uma escala de 0 (sem probabilidade) a 1 (probabilidade máxima), forneceu valores de 0,8 - 1,0; 0,5 - 0,8 e 0,4 para sêmen fresco, refrigerado e congelado respectivamente, demonstrando que o sêmen refrigerado possui problemas de fertilidade semelhantes aos do sêmen congelado em grau sensivelmente menor, resultando em uma capacidade intermediária de fertilização.

MAXWELL e WATSON (1996) sugerem que espermatozóides conservados requerem menos tempo de capacitação no trato genital feminino, e que podem fertilizar oócitos prontamente, se depositados próximos ao local de ovulação, como ocorre na fertilização *in vitro*, tubárica ou intra-uterina.

SMITH *et al.*, (1975); SOUZA (1994) e SALAMON e MAXWELL (1995) trabalhando com sêmen congelado e SALAMON *et al.*, (1977) trabalhando com sêmen refrigerado verificaram que os baixos índices de fecundação de ovelhas inseminadas por via cervical são atribuídos às dificuldades dos espermatozóides serem transportados através do canal cervical e à diminuição da viabilidade espermática. Estas barreiras podem ser a causa da morte de grande número de espermatozóides resultando em quantidade espermática insuficiente para a fecundação.

As taxas de prenhez obtidas na inseminação cervical superficial (43,75%) e intra-uterina (85,71%), conforme demonstra a tabela 10, seguiram a mesma tendência daqueles apresentados por SALAMON *et al.* (1977), os quais observaram 40% e 94,4% de óvulos fertilizados quando procederam a inseminação com sêmen refrigerado a 5°C em TRIS por 2

dias em deposição cervical e uterina, respectivamente. Provavelmente os resultados de fertilidade encontrados por estes autores foram superiores aos deste experimento, porque naquele se utilizou estro natural e também não se levou em conta a mortalidade embrionária, uma vez que os zigotos foram recolhidos 50 a 60 horas após a inseminação.

Segundo LUNSTRA e CHRISTENSON (1981), ovelhas que tiveram o estro induzido possuem índices inferiores de fertilidade porque o tratamento progestágeno mais eCG têm um efeito nocivo no transporte, sobrevivência e capacidade de fertilização dos espermatozóides, independente da estação do ano em que é utilizado; assim como promove aumento na mortalidade embrionária quando comparado com ovelhas inseminadas em estro natural.

Para EDEY (1969), além do efeito da sincronização, o aumento na mortalidade embrionária pode ocorrer devido aos processos de refrigeração ou congelação do sêmen, os quais promovem o envelhecimento dos espermatozóides que, apesar de promoverem a fertilização, causam aumento no número de mortes de embriões.

LANGFORD *et al.*, (1979) trabalhando com sêmen congelado verificaram taxa de mortalidade embrionária de 33% quando comparada a 6% ocorrida com sêmen fresco. No Brasil, JOBIM (1987) verificou diferença de 10% de ovelhas que não retornaram ao estro dentro de 21 dias após a IA com sêmen refrigerado, e não pariram, sugerindo a ocorrência de mortalidade embrionária. Em inseminação após 48 horas de refrigeração com sêmen diluído em água de coco, CRUZ (1994) obteve 40,74% de gestações em exame ultrassonográfico realizado aos 53 dias, porém algumas vesículas embrionárias que apresentavam reduzido tamanho não se desenvolveram e a taxa de nascimento foi de apenas 11,11%.

Considerando-se os grupos de ovelhas inseminadas por via cervical superficial, em diferentes horários após a retirada dos pessários, com sêmen refrigerado em diluente citrato-gema (tabela 10), foram

observadas diferenças significativas ($P < 0,05$), ao se obter 21,74% e 43,75% de prenhez para a inseminação às 49 ± 1 e 57 ± 1 horas, respectivamente.

A taxa de prenhez obtida às 57 ± 1 horas foi semelhante aos resultados de BARLOW *et al.*, (1974) que em inseminação dupla, às 50 e 64 após a retirada das esponjas obtiveram 42% de concepção utilizando sêmen refrigerado a 15°C em diluente citrato-glicose-gema.

Considerando que a ovulação ocorre $65,1 \pm 2,2$ horas após a retirada das esponjas (SOUZA *et al.*, 1997), a inseminação mais próxima ao momento de ovulação (57 horas) apresentou resultados superiores de prenhez concordando com os resultados de HUNTER *et al.*, (1982), os quais obtiveram taxas de fertilização de 94,4% e somente 20% para montas realizadas 24 horas e imediatamente após o início do estro, respectivamente. Por sua vez JONES *et al.*, (1969), obtiveram 51,8% e 29,9% de taxa de não retorno quando utilizaram sêmen refrigerado via cervical, às 0 - 14 e 14 - 24 horas após o início do estro natural, não sinalizando maior fertilidade quando a inseminação ocorreu mais próxima da ovulação, que ocorre por volta de 30 horas após o início do estro (MILLER, 1986). MATTNER e BRADEN (1969) observaram maior número de espermatozóides na cérvice e útero quando se utilizou sêmen fresco nas primeiras 24 horas após o início do estro natural, explicando que este fato pode ser atribuído à diferença do estado físico do muco cervical durante o decorrer do estro. Essa discrepância de resultados pode ser explicada pela variação no momento de ovulação em função da raça, manejo e ambiente (AGUINSKY e CANABARRO FILHO, 1988)

EVANS *et al.*, (1986) concluíram que o momento da inseminação é muito mais crítico quando se utiliza sêmen congelado, uma vez que o número de óvulos fertilizados em ovelhas superovuladas inseminadas com sêmen congelado por via intra-uterina às 64 horas após a retirada das esponjas foi significativamente maior em relação às 24 ou 44 horas, não havendo diferença entre os horários de 24, 44 ou 64 horas quando

utilizaram sêmen fresco.

Menor sobrevivência espermática após congelação foi comprovada por LOGINOVA e ZHELTOBRYUK (1975) ao constatarem que o sêmen fresco sobrevivia por mais que 17 horas nos ovidutos enquanto que os espermatozóides congelados não chegavam a 10 horas.

Portanto, a longevidade dos espermatozóides no trato genital feminino, a qual está relacionada ao modo de conservação do sêmen, determina o grau de importância do horário de inseminação sobre a fertilidade.

Provavelmente as baixas taxas de gestação das ovelhas inseminadas por via cervical superficial neste experimento, ocorreram devido a somatória de fatores sugeridos por CÓRDOVA (1989) como: redução da capacidade fertilizante dos espermatozóides durante o armazenamento, aumento da taxa de mortalidade embrionária e principalmente pela diminuição da viabilidade espermática no aparelho genital feminino.

A conservação do sêmen ovino durante algumas horas pelo processo de refrigeração pode viabilizar o aumento do uso de bons reprodutores entre fazendas próximas, dispensando o uso da congelação do sêmen. Porém para a obtenção de altas taxas de prenhez torna-se necessária a utilização de inseminação artificial intra-uterina, uma vez que a via cervical superficial fornece resultados razoáveis de fertilidade.

6 CONCLUSÕES

1. O citrato-gema apresenta melhor capacidade de preservação para o sêmen refrigerado ovino que os diluentes CUE, CU-16, glicina-gema, leite UHT-gema e TRIS-gema.
2. Melhores taxas de prenhez são obtidas quando se deposita o sêmen refrigerado por via intra-uterina em relação à deposição cervical superficial.
3. É possível refrigerar o sêmen ovino por 8 horas, obtendo-se bons resultados de prenhez com a utilização da inseminação artificial por via intra-uterina.
4. A inseminação realizada às 57 ± 1 horas após a retirada dos pessários apresenta taxa de prenhez superior em relação a inseminação realizada às 49 ± 1 horas.
5. São necessários mais estudos para a determinação das causas que promovem baixa fertilidade ao se utilizar sêmen conservado por via cervical em ovinos.

ANEXO 1

FÓRMULA DOS DILUENTES

DILUENTE CUE, segundo FOOTE e BRATTON (1960):

CITRATO DE SÓDIO 2H ₂ O.....	1,45 g
BICARBONATO DE SÓDIO.....	0,21 g
CLORETO DE POTÁSSIO.....	0,04 g
GLICOSE ANIDRA.....	0,3 g
GLICINA.....	0,937 g
ÁCIDO CÍTRICO.....	0,087 g
ÁGUA TRIDESTILADA E DEIONIZADA qsp.....	100 ml
80 PARTES DE DILUENTE PARA 20 PARTES DE GEMA DE OVO	

DILUENTE CU - 16, segundo FOOTE e BRATTON (1960):

CITRATO DE SÓDIO 2H ₂ O.....	1,45 g
GLICOSE ANIDRA.....	1,25 g
GLICINA.....	0,937 g
ÁGUA TRIDESTILADA E DEIONIZADA qsp.....	100 ml
80 PARTES DE DILUENTE PARA 20 PARTES DE GEMA DE OVO	

DILUENTE GLICINA - GEMA, segundo AHMED (1955):

GLICINA.....	3 g
ÁGUA TRIDESTILADA E DEIONIZADA	100 ml
75 PARTES DE DILUENTE PARA 25 PARTES DE GEMA DE OVO	

DILUENTE CITRATO - GEMA, segundo EVANS e MAXWELL (1987):

CITRATO DE SÓDIO 2H ₂ O.....	2,37 g
GLICOSE ANIDRA.....	0,8 g
GEMA DE OVO.....	20 ml
ÁGUA TRIDESTILADA E DEIONIZADAqsp.....	100 ml

DILUENTE LEITE UHT-GEMA, segundo SCHINDLER e AMIR (1961):

LEITE LONGA VIDA DESNATADO ⁸	90 ml
GEMA DE OVO.....	10 ml

DILUENTE TRIS-GEMA, segundo EVANS e MAXWELL (1987):

TRIS (HIDROXIMETHIL) AMINOMETANO.....	3,634 g
FRUTOSE.....	0,50 g
ÁCIDO CÍTRICO.....	1,99 g
GEMA DE OVO.....	14 ml
ÁGUA TRIDESTILADA E DEIONIZADA qsp.....	100 ml

⁸ BATAVO – Usina de Beneficiamento – Cooperativa Central de Laticínios do Paraná LTDA.

ANEXO 2

CÁLCULOS ESTATÍSTICOS

Para a comparação do sêmen fresco com o sêmen diluído e os diluentes entre si foi utilizada Análise de Variância sendo o modelo de ANOVA escolhido o seguinte:

$$Y_{ij} = m + a_i + b_j + e_{ij} \quad i = 0, \dots, 6 \text{ e } j = 1, \dots, 23$$

onde:

μ = média

α = efeito dos diluentes

β = efeito das datas de colheita (blocos)

ε = resíduos

Análise de Variância - 8 horas após refrigeração

Fontes de Variação	Soma de Quadrados	g.l.	Quadrado Médio	F	p-valor
Diluentes	583,44585	6	97,240975	118,177	0,0000
Datas (bloco)	34,19833	22	1,554469		
Resíduo	108,61486	132	0.8228398		
Total	726,25904	160			

Resultado do Teste de Tukey ($\alpha=0.05$) - 8 horas após refrigeração

Diluentes	Número de Datas	Média	Resultado do Teste
glicina-gema	23	-3.013	X
leite UHT-gema	23	-0.740	X
CU-16-gema	23	-0.489	X
TRIS-gema	23	-0.232	X
CUE	23	-0.164	X
citrato-gema	23	0.657	X
fresco	23	3.872	X

Na construção da Análise de Variância, considerou-se a variável resposta obtida na análise de componentes principais: variável TT.

O modelo de ANOVA escolhido é dado por:

$$y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \varepsilon_{ij} \quad i = 0, \dots, 4 \text{ e } j = 1, \dots, 7$$

onde:

μ é uma constante inerente à todas as observações;

α_i é o efeito do i-ésimo diluente (tratamentos);

β_j é o efeito da j-ésima data de colheita (blocos)

ε_{ij} é o resíduo referente ao ajuste da observação do i-ésimo diluente e da j-ésima data ao modelo.

Análise de Variância - TT

Fontes de Variação	Soma de Quadrados	g.l.	Quadrado Médio	F	Valor-p
Diluentes	104.64624	3	34.882079	8.527	0.0010
Datas (bloco)	92.78271	6	15.463785	3.780	
Resíduo	73.63055	18	4.090586		
Total	271.05950	27			

Resultado do Teste de Tukey ($\alpha=0.05$) - TT

Diluentes	Número de Datas	Médias	Resultado do Teste
TRIS - gema	7	-1.86807	X
CU - 16	7	-1.02437	X
CUE	7	-0.31834	X
citrato - gema	7	3.21078	X

Análise de Variância - defeitos maiores

Fontes de Variação	Soma de Quadrados	g.l.	Quadrado Médio	F	Valor-p
Diluentes	7.171429	6	1.1952381	1.045	0.4069
Datas (bloco)	60.317857	9	6.7019841	5.860	
Resíduo	61.757143	54	1.1436508		
Total	129.24643	69			

Observa-se que para o fator defeitos maiores obteve-se valor- $p=0.4069$, indicando que não existe diferença entre os diluentes e o sêmen fresco, ao nível de significância de 5%.

Análise de Variância - total de defeitos menores

Fontes de Variação	Soma de Quadrados	g.l.	Quadrado Médio	F	Valor-p
Diluentes	937.88571	6	156.31429	4.478	0.0010
Datas (bloco)	628.41429	9	69.82381	2.000	
Resíduo	1885.1857	54	34.910847		
Total	3451.4857	69			

Resultado do Teste de Tukey ($\alpha=0.05$) - total de defeitos menores

Diluentes	Número de Datas	Média	Resultado do Teste	
Fresco	10	10.05	X	
glicina - gema	10	15.90	X	X
CUE	10	16.95	X	X
citrato - gema	10	17.45	X	X
leite UHT - gema	10	19.30		X
TRIS - gema	10	19.40		X
CU -16	10	22.85		X

Análise de Variância - acrossoma desprendido

Fontes de Variação	Soma de Quadrados	g.l.	Quadrado Médio	F	Valor-p
Diluentes	30.93571	6	5.155952	1.296	0.2747
Datas (bloco)	187.07143	9	20.785714	5.226	
Resíduo	214.77857	54	3.977381		
Total	432.78571	69			

Análise de variância para os dados transformados de cauda enrolada

Fontes de Variação	Soma de Quadrados	g.l.	Quadrado Médio	F	Valor-p
Diluentes	27.195383	6	4.5325638	6.547	0.0000
Datas (bloco)	18.419264	9	2.0465849	2.956	
Resíduo	37.386994	54	0.6923517		
Total	83.001640	69			

Resultado do Teste de Tukey ($\alpha=0.05$) - cauda enrolada

Diluentes	Número de Datas	Médias	Resultado do Teste		
Fresco	10	1.43265	X		
glicina - gema	10	1.96266	X	X	
citrato - gema	10	2.61350		X	X
TRIS - gema	10	2.79261		X	X
CUE	10	2.86401		X	X
leite UHT - gema	10	2.95793		X	X
CU-16	10	3.44730			X

Análise de Variância - outros defeitos menores

Fontes de Variação	Soma de Quadrados	g.l.	Quadrado Médio	F	Valor-p
Diluentes	71.10000	6	11.850000	2.920	0.0154
Datas (bloco)	515.46071	9	57.273413	14.115	
Resíduo	219.11429	54	4.056720		
Total	805.67500	69			

Resultado do Teste de Tukey ($\alpha=0.05$) - outros defeitos menores

Diluentes	Número de Datas	Médias	Resultado do Teste	
CUE	10	3.05	X	
Fresco	10	3.50	X	X
citrato - gema	10	3.80	X	X
CU - 16	10	3.85	X	X
leite UHT - gema	10	4.95	X	X
TRIS - gema	10	5.20	X	X
glicina - gema	10	6.10		X

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGUER, D.; PAREZ, V.; BELLOC, J.P.; BRIOIS, M. Routine use of oestrus synchronisation and artificial insemination with fresh diluted semen. A survey on 2.782.735 ewe lambs and adult ewes. In: INTERNACIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION (12 : 1992 : The Hague). **Proceedings...** The Hague, 1992. p. 1520-1522.
2. AGUINSKY, P.; CANABARRO FILHO, C.E. Inseminação intra-uterina em ovinos de corte com sêmen congelado. Emprego da via transperitoneal por laparoscopia. **A Hora Veterinária**, v. 42, p. 5-7, 1988.
3. AHMED, S.I. Effect of glycine on storage of ram semen. **Journal Agricultural Science**, v. 46, p. 164-167, 1955.
4. AMIR, D.; SCHINDLER, H.; EYAL, E.; LEHRER, A.R.; KEMPENICH-PINTO, O. The effect of the ratio of dilution of ram semen in different diluents on the conception rate. **Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique**, v. 13, n. 1, p. 1-5, 1973.
5. BARLOW, M.; PRYCE-JONES, D.; REED, H.C.B. MLC sheep AI field trials: A comparison of milk and egg yolk diluents. **The Veterinary Record**, v. 94, n. 8-16, p. 159-160, fev. 1974.
6. BARTH, A.D.; OKO, R.J. **Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa**. 1. ed. Arnes : Iowa State University Press, 1989.

7. BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Nordisk Veterinarmedicin**, v. 25, p. 282-391, 1973.
8. BUTSWAT, I.S.; OSINOWO, O.A.; DIM, N.I. Fertility test for ram semen preserved at ambient temperatures by discontinuous flow dialysis. **Theriogenology**, v. 34, n. 4, p. 795-799, 1990.
9. BUTSWAT, I.S.; OSINOWO, O.A.; DIM, N.I. Studies on ram semen preservation at ambient temperatures by flow dialysis techniques. **Tropical Agriculture**, v. 69, n. 2, p. 145-148, 1992.
10. CARMENATE, P.C.; GAMCIK, P. Conservation of ram semen by various dilutors at room temperature and at 5°C in relation to fertility of sheep. **Folia Veterinaria**, v. 26, n. 1, p. 53-64, 1982.
11. COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. Belo Horizonte, 1998.
12. CHEMINEAU, P.; COGNIÉ, Y. **Training manual on artificial insemination in sheep and goats**. Rome : FAO, p. 222, 1991.
13. COLAS, G. ; DAUZIER, L.; COUROT, M.; ORTAVANT, R.; SIGNORET, J. Some results obtained from important factors studied of A.I. **Annales de Zootechnie**, v. 17, p. 47-49, 1968.
14. CÓRDOVA, M.; FELDMAN, D.; VALENCIA, J.; ORTÍZ, A. Fertilidad de ovejas inseminadas utilizando dos diluyentes para semen fresco. **Vet. Méx.**, v. 20, p. 419-422, 1989.

15. CRUZ, J. F. da. **Conservação e fertilidade do sêmen ovino mantido a temperatura de + 4°C por um período de 48 horas diluído em frações ativas de água de coco.** Fortaleza, 1994. Dissertação, (Mestrado em Produção e Reprodução de Pequenos Ruminantes), Universidade Estadual do Ceará.
16. DAUZIER, L.; THIBAUTT, C.; WINTENBERGER, S. **Animal Breeding Abstract.** v. 23, p. 1248, 1954.
17. DEKA, B. C.; RAO, A. R. Preservation of ram semen. **Indian Veterinary Journal**, v. 57, p. 130-134, 1980a.
18. DEKA, B. C.; RAO, A. R. Effect of extenders on the biometrics of ram sperm head. **Indian Veterinary Journal**, v. 57, p. 905-908, 1980b.
19. DREVIUS, L. O. Spiralization in tails of mammalian spermatozoa in hypotonic media. **Nature**, v. 197, p. 1123-1124, 1963.
20. DZIUK, P.J.; LEWIS, J.M.; GRAHAM, E.F.; MOYER, R.H. Comparison between natural service and artificial insemination with fresh or frozen sperm at an appointed time in the ewe. **Journal Animal Science**, v. 35, n. 3, p. 572-575, 1972.
21. EDEY, T.N. Prenatal mortality in sheep: a review. **Animal Breeding Abstracts**, v.37, n.2, p.173-190, 1969.
22. EPPLESTON, J.; ROBERTS, E.M. The effect of progestagen, PMSG and time of insemination on fertility in ewes following intra uterine insemination with frozen semen. **Australian Veterinary Journal**, v. 63, n. 4, p. 1114-1115, 1986.

23. EPPLESTON, J.; SALAMON, S.; MOORE, N.W.; EVANS, G. The depth of cervical insemination and site of intra-uterine insemination and their relationship to the fertility of frozen-thawed ram semen. **Animal Reproduction Science**, v. 36, p. 211-225, 1994.

24. EVANS, G.; JABBOUR, H.N.; MOORE, N.W. Time of intra-uterine insemination of superovulated ewes using fresh and frozen semen. In: A. CONF. A. SOC. REP. BIOL. (18 : 1986 : Sydney). **Proceedings...** Sydney : Soc. Rep. Biol., 1986. p. 18.

25. EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. **Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats**. Sydney : Butterworths, 1987.

26. EVANS, G. Semen Processing. In: REFRESHER COURSE FOR VETERINARIANS (96 : 1987 : Sydney). **Proceedings...** Sydney : The Post-Graduated Committe in Veterinary Science, 1987. p. 1-5.

27. FERNANDEZ-ABELLA, D. **Principios de fisiologia reproductiva ovina**. Montevideo : Editorial Agropecuaria Hemisferio Sur SRL, 1993. 247p.

28. FERNANDEZ ABELLA, D.; VILLEGAS, N. Estudio de la fertilidad y prolificidad en primavera, en ovejas sincronizadas con CIDR'G y esponjas de MAP. **Boletin Tecnico de Ciencias Biologicas Universidad de la Republica**, v. 5, p. 29-34, 1995.

29. FLIPSE, R.J.; ALMQUIST, J.O. Diluters for bovine semen. IX - Motility of bovine spermatozoa in milk-glycine and egg yolk-without glycerol. **Journal of Dairy Science**, v. 39, n. 12, p. 1690-1696, 1956.

30. FOOTE, R. H.; BRATTON, R. W. Survival of bovine spermatozoa stored at 5 and 25°C in extenders containing varying levels of egg yolk, glucose, glycine, glycerol, citrate, and others salts. **Journal of Dairy Science**, v. 43, n. 9, p. 1322-1329, 1960.
31. FUKUI, Y.; ROBERTS, E.M. Further studies on non-surgical intrauterine technique for artificial insemination in the ewe. **Theriogenology**, v. 10, n. 5, p. 381-386, 1978.
32. HALBERT, G.W.; DOBSON, H.; WALTON, J.S.; BUCKRELL, B.C. A technique for transcervical intra-uterine insemination of ewes. **Theriogenology**, v. 33, n. 5, p. 993-1010, 1990.
33. HILL Jr., J.R.; HURST, V.; GODLEY, W.C. A comparison of reconstituted skim milk and egg yolk-sodium citrate as extenders for ram semen. **American Journal of Veterinary Research**, v. 19, p. 132-134, 1958.
34. HUNTER, R.H.F.; BARWISE, L.; KING, R. Sperm transport, storage and release in the sheep oviduct in relation to the time of ovulation. **British Veterinary Journal**, v. 138, p. 225-232, 1982.
35. JOBIM, M.I.M.; OBERST, E.R.; MIES FILHO, A.; VIEIRA, J.M.S. Inseminação artificial em ovinos com sêmen refrigerado. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 11, n. 4, p. 163-167, 1987.
36. JONES, R.C. Studies of the suitability of preparations of ewe and cow milk for storing ram spermatozoa at 37, 5, and - 79°C. **Australian Journal of Biological Science**, v. 22, p. 983-994, 1969.

37. KHARCHÉ, K.G.; PANGAWKAR, G.R.; MITTAL, V.P. Effect of certain dilutors on the morphology of ram spermatozoa on preservation at 5°C. **Indian Veterinary Journal**, v. 53, p. 694-698, set. 1976.
38. KILLEN, I.D.; CAFFERY, G. J. Uterine insemination of ewes with the aid of a laparoscope. **Australian Veterinary Journal**, v. 59, p. 95, 1982.
39. LANGFORD, G. A.; MARCUS, G. J.; HACKETT, A. J.; AINSWORTH, L.; WOLYNETZ, M. S.; PETERS, H.F. A comparison of fresh and frozen semen in the insemination of confined sheep. **Canadian Journal Animal Science**, v. 59, p. 685-691, 1979.
40. LAPWOOD, K.R.; MARTIN, I.C.A.; ENTWISTLE, K.W. The fertility of merino ewes artificially inseminated with semen diluted in solutions based on skim milk, glucose or ribose. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 23, p. 457-466, 1972.
41. LOGINOVA, N.V.; ZHELTOBRYUKH, N.A. The survival of frozen ram spermatozoa in different parts of the genital tract of ewes. **Animal Breeding Abstract**, v. 43, p. 287, 1975.
42. LÓPEZ-BREA, J.J.G. Inseminación artificial en ganado ovino. In: Curso Internacional de Reproducción Animal (19 : 1996 : Madrid). **Proceedings...** Madrid : INIA, 1996. p. 01-14.
43. LUNSTRA, D.D.; CHRISTENSON, R. K. Fertilization and embryonic survival in ewes synchronized with exogenous hormones during anestrus and oestrus season. **Journal of Animal Science**, v. 53, n. 2, p. 458-465, 1981.

44. LUZ, S. L. N. **Inseminação intra-uterina por laparoscopia em ovinos.** Santa Maria, 1991. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria.
45. MACHADO, R.; SIMPLÍCIO, A.A. **Inseminação artificial em ovelhas deslanadas.** Sobral : EMBRAPA - CNPC, 1990.
46. MARTIN, I.C.A. Milk and synthetic diluents for ram semen. In: VI CONG. INTER. REPROD. ANIM. INSEM. ARTIF. (vol 2 : 1968: Paris). **Proceedings ...** Paris, 1968. p. 1619-1622.
47. MARTIN, I.C.A.; WATSON, P.F. Artificial insemination of sheep: effects on fertility of number of spermatozoa inseminated and of storage of diluted semen for up to 18 hours at 5°C. **Theriogenology**, v. 5, n. 1, p. 29-35, 1976.
48. MATTNER, P.E.; BRADEN, W.H. Effect of time of insemination on the distribution of spermatozoa in the genital tract in ewes, **Australian Journal Biological Science**, v. 22, p. 1283-1286, 1969.
49. MAXWELL, W.M.C. Artificial insemination of ewes with frozen-thawed semen at a synchronised oestrus. I. Effect of time of onset of oestrus, ovulation and insemination on fertility. **Animal Reproduction Science**, v. 10, p. 301-308, 1986.
50. MAXWELL, W.M.C.; HEWITT, L.J. A comparison of vaginal, cervical and intra-uterine insemination of sheep. **Journal Agricultural Science**, v. 106, p. 191-193, 1986.

51. MAXWELL, W.M.C.; WATSON, P.F. Recent progress in the preservation of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 55-65, 1996.
52. MIES FILHO, A.; RAMOS, A.A. Inseminação artificial em ovinos - resultados obtidos com sêmen conservado, submetido a diferentes formas de uso. **Boletim de Inseminação Artificial**, v. 6, n. 1, p. 28-34, 1954.
53. MIES FILHO, A.; DUTRA, J.; SELAIVE-VILLARROEL, A.B. Influência da dose e local de aplicação do sêmen congelado em ovinos. **A Hora Veterinária**, n. 12, p. 25-27, 1983.
54. MIES FILHO, A. **Inseminação Artificial**. 6. ed. Porto Alegre : Sulina, 1987. p. 610-634.
55. MILLER, S. J. Artificial breeding techniques in sheep. In: MORROW, D. A. **Current Therapy in Theriogenology**. Philadelphia : W. B. Saunders Company, 1986. p. 884-893.
56. MORAES, J.C.F.; OLIVEIRA, N.R.M. Componentes da avaliação andrológica e seu emprego na seleção de carneiros Romney Marsh. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 20, n. 1, p. 23-29, 1996.
57. NEVES, J.P.; IRALA, P.N.D.; GONZALEZ, C.I.M.; DORNELLES, W.J.M. Utilização do diluente TRIS na inseminação artificial em ovinos. **Revista do Centro de Ciências Rurais**, v. 12, n. 2-3, p. 181-187, 1982.

58. NEVES, J. P. Novas técnicas de inseminação artificial em ovinos. In: **Caprinocultura e Ovinocultura**, Piracicaba : Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1990. p. 57-67.
59. NEVES, J.P.N.; LUZ, S.L.N. Inseminação laparoscópica em ovelhas com cio natural induzido e sincronizado antes e durante a estação reprodutiva. **Ciência Rural**, v. 24, n. 1, p. 133-137, 1994.
60. OLIVEIRA, J.F.C. **Influência da centrifugação, composição do diluente, dose e momento de aplicação no sêmen ovino congelado**. Santa Maria, 1987. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria.
61. PAGANINI, FILHO, P., BICUDO, S.D., SOUZA, M.I.L., SOUSA, D.B. Viabilidade do sêmen ovino frente a três diluidores em temperaturas de 37°C e sob refrigeração. In: XII CONG. BRAS. REPR. ANIM. (21 : 1997 : Belo Horizonte). **Anais ...** Belo Horizonte : CBRA, 1997. p. 61.
62. PETRUZZI, V.; TARANTINI, S.; ROYCHOUDHURY, P.N. Effect of different semen diluents on survival of ram spermatozoa at 5°C. **Zentralblatt für Veterinarmedizin**, v. 23, n. 7, p. 556-561, 1976.
63. PRASAD, M.M.; NORMAN, C. Conservation of ram semen at room temperatures following storage at 5°C. In: 2ND WLD. CONF. ANIM. PROD. (2 : 1969) **Proceedings...**, 1931. p. 431.

64. RODRIGUEZ, F.; BALDASSARRE, H.; SIMONETTI, J.; ASTE, F.; RUTTLE, J.L. Cervical versus intra-uterine insemination of ewes using fresh or frozen semen diluted with aloe vera gel. **Theriogenology**, v. 30, n. 5, p. 843-854, 1988.
65. ROY, A.; BISHOP, M.W.H. Effect of glycine on the survival of bull spermatozoa in vitro. **Nature**, v. 174, p. 746-747, 1954.
66. SALAMON, S.; LIGTHFOOT, R.J. Fertility of ram spermatozoa frozen by the pellet method: III. The effects of insemination technique, oxytocin and relaxin on lambing. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 22, p. 409-423, 1970.
67. SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C.; FIRTH, J.H. Fertilizing capacity of ram spermatozoa stored at 5°C. **Theriogenology**, v. 8, n. 4, p. 200, 1977.
68. SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of ram semen: II Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. **Animal Reproduction Science**, v. 38, p. 1-36, 1995.
69. SAHNI, K.L.; ROY, A. Influence of season on semen quality of rams and effects of dilutors and dilutions on in vitro preservation. **Indian Journal Animal Science**, v. 39, p. 1, 1969.
70. SAXENA, V.B.; SINGH, G. Preservation of ram spermatozoa. I. Effects on motility, livability and morphology of ram spermatozoa in four semen diluents. **Journal Anim. Morph. Physiol.**, v. 14, n. 1, p. 114, 1967.

71. SCHINDLER, H.; AMIR, D. Longevity of ram sperm in various diluent and at different dilution rates. **Journal Agricultural Science**, v. 56, p. 183-189, 1961.
72. SEAB. **Acompanhamento da Situação Agropecuária do Paraná**, Curitiba, v. 23, n. 5, p. 52-59, 1997.
73. SMITH, P.A.; BOLAND, M.P.; GORDON, I. Conception rate in ewes: effect of method of breeding and number of inseminations. **Journal Agricultural Science**, v. 91, p. 511-512, 1978.
74. SMITH, J.F.; BOYS, P.T.S.; DROST, H.; WILLSON, S.G. A. I. of sheep with frozen semen. **Animal Production.**, v. 35, p. 71-77, 1975.
75. SOUZA, M.I.L. **A via cervical na inseminação artificial ovina com sêmen congelado**. Santa Maria, 1993. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria.
76. SOUZA, C.J.H. de; CHAGAS, L.M.; MOURA, A.; MORAES, J.C.F. Momento da ovulação em ovelhas Corriedale após cio natural e induzido com progestágeno e eCG. **Ciência Rural**, v. 25, n. 2, p. 277-281, 1995.
77. SOUZA, M.I.L.; LUZ, S.L.N.; GONÇALVES, P.B.D.; NEVES, J.P. Características morfológicas e penetrabilidade cervical visando a inseminação artificial em ovinos. **Ciência Rural**, v. 24, n. 3, p. 591- 595, 1994.

78. THACKER, D.L.; FLIPSE, R.J.; ALMQUIST, J.O. Diluters for bovine semen: II Effect of milk proteins upon spermatozoan livability. **Journal of Dairy Science**, v. 37, n. 2, p. 220-227, 1954.
79. TIWARI, S.B.; SRIVASTAVA, A.K. SAHNI, K.L. Some metabolic changes in ram semen stored in the milk diluent. **Indian Veterinary Journal**, v. 54, p. 111-115, 1977.
80. VEKSLER HESS, J.; GHIRARDI, M.; DECAMINADA, E.; TREZEGUET, M.; LAVALLE, N.; COPPOLA, M. Comportamento do sêmen ovino frente a variações de osmolaridade e pH. In: XII CONG. BRAS. REPR. ANIM. (21 : 1997 : Belo Horizonte). **Anais ...** Belo Horizonte : CBRA, 1997. p. 59.
81. WATSON, P.F.; MARTIN, I.C.A. Artificial insemination of sheep: the fertility of semen extended in diluents containing egg yolk and inseminated soon after dilution or stored at 5°C for 24 or 48 hours. **Theriogenology**, v. 6, n. 5, p. 553-558, 1976.